

**Università Degli Studi Di Napoli “Federico II”**



**Dipartimento di Agraria**

**Dottorato di ricerca  
in  
Scienze e Tecnologie delle Produzioni  
Agroalimentari - Acquacoltura  
XXVIII Ciclo**

**Marteiliosi in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) allevati in Campania: caratterizzazione  
molecolare e valutazione dell'impatto zootecnico**

**Candidato: Dr.ssa Doriana Iaccarino**

**Coordinatore:  
Ch.mo Prof.  
Giancarlo Barbieri**

**Tutor:  
Ch.ma Prof.ssa  
Carmela Maria Assunta Barone**

# INDICE

	INTRODUZIONE		
1	CAPITOLO I	La Marteiliosi	
1.1		Agente eziologico della Marteiliosi.....	1
1.2		Specie ospiti e distribuzione geografica.....	1
1.3		Sviluppo di <i>Marteilia</i> spp. nei molluschi bivalvi.....	2
1.4		Ciclo vitale di <i>Marteilia</i> spp.....	3
1.5		Organi bersaglio e meccanismo d'azione di <i>Marteilia</i> spp.....	4
2	CAPITOLO II	I fattori incidenti sulla trasmissione della Marteiliosi	
2.1		Fattori ambientali e zootecnici.....	7
2.2		Temperatura e stagionalità della malattia.....	7
2.3		Patogenicità ed interazione ospite-parassita.....	8
2.4		Sensibilità delle specie ospiti.....	9
3	CAPITOLO III	Rilevanza socio-economica della Marteiliosi	
3.1		Mortalità e morbosità.....	10
3.2		Segni clinici di malattia.....	10
3.3		Studi di monitoraggio.....	10
4	CAPITOLO IV	La malattie notificabili	
4.1		Quadro normativo: dal primo atto legislativo ad oggi.....	12
4.2		Malattie notificabili dei molluschi bivalvi e sorveglianza sanitaria.....	12
4.3		Misure minime di lotta contro le malattie notificabili.....	16
4.4		Laboratori di riferimento.....	17
4.5		Future prescrizioni: Decisione di esecuzione 2015/1554/UE.....	17
4.6		Prescrizioni specifiche per il campionamento.....	18
4.7		Diagnosi delle malattie notificabili.....	19
5	CAPITOLO V	Applicazione delle prescrizioni e dati epidemiologici	
5.1		Limiti nel settore della molluschicoltura.....	21
5.2		Molluschicoltura: dati produttivi europei ed italiani.....	21
5.3		Quadro epidemiologico dell'U.E.....	24
5.4		Sistemi di allevamento e gestione igienico-sanitaria.....	25
5.5		Buone prassi igieniche ed operative.....	26
6	CAPITOLO VI	Obiettivi dello studio.....	28
7	CAPITOLO VII	Materiali e metodi	
7.1		Georeferenziazione e descrizione degli allevamenti monitorati.....	29
7.2		Ricerca di <i>Marteilia</i> spp.....	31
7.3		Caratterizzazione molecolare di <i>M. refringens</i> .....	31
7.4		Valutazione dell'intensità dell'infezione di <i>M. refringens</i> .....	32
7.5		Determinazione del sesso e dello stadio gonadico.....	32
7.6		Valutazione della morfometria e delle alterazioni morfologiche.....	33
7.7		Valutazione dei fenomeni patologici.....	33
7.8		Valutazione degli indici dello stato fisiologico.....	33
7.9		Valutazione degli indici di qualità merceologica.....	33
7.10		Ricerca e quantificazione di <i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo.....	34
7.11		Ricerca e quantificazione di metalli pesanti.....	34
7.12		Analisi statistica.....	34
8	CAPITOLO VIII	Risultati e discussioni	
8.1		Prevalenza e stagionalità dell'infezione di <i>M. refringens</i> .....	35
8.2		Conferma e caratterizzazione molecolare di <i>M. refringens</i> .....	37
8.3		Intensità, stadi di sviluppo e sito d'infezione.....	38
8.4		Stagionalità del ciclo gametogenico.....	40
8.5		Morfometria ed alterazioni morfologiche.....	43
8.6		Fenomeni patologici.....	46
8.7		Indici dello stato fisiologico.....	49
8.8		Indici di qualità merceologica.....	51
8.9		Parametri microbiologici e tossicologici di qualità dell'ambiente di allevamento.....	52
9	CAPITOLO IX	Conclusioni.....	55
10	BIBLIOGRAFIA	.....	57

## INTRODUZIONE

La molluschicoltura è il settore che caratterizza prevalentemente l'acquacoltura dell'Unione Europea (U.E.) e rappresenta la principale voce produttiva dell'acquacoltura italiana, basata prevalentemente sull'allevamento di mitili *Mytilus galloprovincialis* e vongole veraci *Tapes philippinatum* (Prioli, 2008). Attualmente, la mitilicoltura rappresenta in Italia, la principale attività di allevamento sia per i quantitativi di prodotto allevato, inferiori soltanto alla Spagna ed alla Francia, che per la diffusione ed il numero di impianti produttivi distribuiti sul territorio nazionale in numerose Regioni adriatiche e tirreniche. In particolare, in Regione Campania la mitilicoltura è un settore particolarmente sviluppato, con ampi tratti del litorale impiegati per la produzione e la raccolta dei mitili ed un volume di produzione massimo stimato per l'anno 2015 paria a 5459 t. Ad oggi, in Campania, risultano attive 18 aree destinate all'allevamento della specie *M. galloprovincialis*, in concessione a consorzi ed a singole imprese, e 12 banchi naturali di altre specie di molluschi. Alla fine degli anni '60 ed all'inizio degli anni '70 la molluschicoltura europea è stata fortemente danneggiata da eventi di mortalità massive attribuiti ad agenti patogeni di natura infettiva (Comps, 1970; Herrbach 1971; Grizel et al 1974; Alderman 1979; Grizel 1985). I molluschi bivalvi mediante il processo di filtrazione concentrano, a livello tessutale, particolato in sospensione di varia natura nonché numerosi agenti patogeni, di natura zoonosica (Sandifer & Sutton-Grier, 2014) e non (Soudant et al., 2013). I patogeni a carattere zoonosico provocano effetti limitati o assenti ai molluschi bivalvi e sono trasmessi ai vertebrati, quali ospiti definitivi, che consumano molluschi crudi o poco cotti (Bellou et al., 2013). I patogeni non zoonosici, che riconoscono i molluschi bivalvi come ospiti definitivi, quali i protozoi *Bonamia exitiosa*, *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*, *Microcytos mackini*, *Perkinsus marinus* (Villalba et al., 2004; Fernández Robledo et al., 2014; Soudant et al., 2013), vincolano, in termini produttivi, le attività di molluschicoltura (Mann et al., 2009). A causa dell'ampia distribuzione geografica e delle gravi ripercussioni sulla molluschicoltura, le malattie sostenute dai suddetti protozoi sono soggette a notifica da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE), allo scopo di giungere ad una più approfondita conoscenza delle malattie dei molluschi bivalvi presenti sul territorio di ogni Paese membro dell'U.E. ed attuare misure sanitarie volte a limitarne la diffusione. La Marteiliosi è una malattia notificabile da parte dell'OIE ed elencata tra le malattie non esotiche nell'allegato IV, parte II del Decreto legislativo n. 148/2008. L'agente eziologico della Marteiliosi è il protozoo *Marteilia refringens*, appartenente al phylum *Cercozoa* ed all'ordine *Paramyxida* e caratterizzato da un ciclo vitale eteroxeno. *M. refringens* è responsabile di alterazioni fisiologiche registrate sia in ostriche che in mitili ed in seguito ad infezione severa, localizzandosi a livello della ghiandola digerente, può interferire direttamente con i processi di filtrazione ed assorbimento delle specie ospiti (Berthe et al., 2004), la cui morte può essere attribuita sia all'ostruzione meccanica dei tubuli digerenti che alla riduzione dell'acquisizione di energia. Nei mitili *M. refringens* è un agente patogeno potenzialmente letale (Villalba et al., 1993a). Sono stati registrati maggiormente effetti subletali, indotti dal parassita ed influenzanti la mitilicoltura dal punto di vista produttivo, come l'inibizione ed il ritardo della gametogenesi e la riduzione significativa dell'indice di condizione (Villalba et al., 1993b).

In considerazione dell'ampia distribuzione geografica di *Marteilia* spp. (Grizel et al., 1974; Perkins and Wolf, 1976; Comps et al., 1986; Moyer et al., 1993; Audemard et al., 2002; Elgharsalli et al., 2013; Adlard & Nolan, 2015) e del potenziale impatto socio-economico attribuito ad eventi di morbosità e mortalità vincolanti la molluschicoltura, l'U.E. ha emanato la Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, ultimo atto legislativo riguardante gli aspetti sanitari degli animali acquatici, in applicazione a decorrere dal 1 aprile 2016, che stabilisce le prescrizioni riguardanti la sorveglianza sanitaria, i metodi diagnostici nonché le misure minime di lotta da applicare per una corretta gestione sanitaria relativamente alle malattie notificabili non esotiche, tra le quali figura, come legiferato dalla normativa attualmente vigente, la Marteiliosi.

# CAPITOLO I

## La Marteiliosi

### 1.1 Agente eziologico della Marteiliosi

L'agente eziologico della Marteiliosi, anche nota come Aber Disease o Patologia della ghiandola digerente, è un parassita protozoo appartenente al phylum *Cercozoa*, all'ordine *Paramyxida* ed al genere *Marteilia* (Chatton et al., 1911; Cavalier-Smith, 1998; Cavalier-Smith & Chao, 2003). Il genere *Marteilia* comprende diverse specie quali: *Marteilia refringens* (Grizel et al., 1974), *M. sydneyi*, agente eziologico della malattia QX (Queensland Unknown X) (Perkins & Wolf, 1976), *M. christiensi* (Comps, 1983), *M. chungmuensis* (Comps et al., 1986) e *M. lengehi* (Comps, 1976). Recentemente, sono state descritte altre due specie: *M. cochillia* in *Cerastoderma edule* in Spagna (Carrasco et al., 2013a, 2013b) e *M. granula* in *Ruditapes philippinarum* in Giappone (Itoh et al., 2014).

Le specie appartenenti al genere *Marteilia* sono accomunate da un processo di sviluppo caratterizzato da sporulazione e gemmazione endogena (Berthe et al., 2000) responsabile di squilibri fisiologici ed, in alcuni casi, della morte degli ospiti (Alderman, 1979; Grizel et al., 1974).

La prima specie descritta è stata *M. refringens* (Grizel et al., 1974), responsabile di mortalità massive in allevamenti di *Ostrea edulis* della Bretagna, in Francia, alla fine degli anni '60 e l'inizio degli anni '70 (Comps, 1970; Herrbach 1971; Grizel et al. 1974; Alderman 1979; Grizel 1985), che hanno esercitato un impatto negativo sull'ostricoltura francese ed europea (Berthe et al., 2004). Anni dopo, è stata registrata la presenza di *Marteilia* sp. in individui di *Mytilus edulis* importati dalla Francia ed allevati in Italia, nella Laguna di Venezia, identificata come *Marteilia maurini* (Comps et al., 1982). La successiva identificazione di *M. refringens* in individui di *Mytilus galloprovincialis* allevati in Galizia mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e reazione a catena della polimerasi (PCR) (Villalba et al., 1992, 1993a), unitamente all'assenza di caratteristiche morfologiche evidenti per discriminare *M. refringens* e *M. maurini*, suggerisce l'esistenza di una singola specie *Marteilia* spp. in grado di infettare, in Europa, sia i mitili che le ostriche (Longshaw et al., 2001; López-Flores et al., 2004). A tal proposito, l'impiego di metodiche molecolari in PCR, con primer aventi come regione bersaglio, lo spaziatore trascritto interno (ITS1) dei geni codificanti per l'RNA ribosomiale (rRNA), (Le Roux et al., 1999, 2001; Berthe et al., 2000; López-Flores et al., 2004), ha permesso di rilevare un dimorfismo nella suddetta regione genica, dimostrando l'esistenza di due genotipi per la specie *M. refringens*, il tipo O ed il tipo M (Le Roux et al., 2001), infettanti preferenzialmente e rispettivamente le ostriche ed i mitili. Tuttavia, entrambi i genotipi, sono stati rilevati sia in ostriche che in mitili e sono state registrate coinfezioni di *M. refringens* tipo M e tipo O in caso di infezioni severe (Carrasco et al., 2007). Inoltre, il genoma di *M. refringens*, tipo O è stato rilevato anche in *Chamelea gallina* mentre, il genoma di *M. refringens*, tipo M in *Solen marginatus* (López-Flores et al., 2004., 2008a, 2008b) ed in *Xenostrobus securis* (Pasqual et al., 2010), confermando ulteriormente l'assenza di una marcata specificità per la specie ospite (Carrasco et al., 2015). Di recente, è stata registrata la presenza di una specie responsabile di mortalità massive in *Cerastoderma edule*, geneticamente correlata alla *M. refringens* e pertanto identificata preliminarmente come *M. refringens* con genotipo tipo C (Carrasco et al., 2013a). Tuttavia, la successiva valutazione, mediante TEM, di caratteristiche morfologiche specifiche, impiegate per discriminare le specie appartenenti al genere *Marteilia* spp. (figura 3), ha permesso di identificare la specie come *M. cochillia* (Carrasco et al., 2013a).

### 1.2 Specie ospiti e distribuzione geografica

La presenza di *Marteilia* spp. è stata registrata in numerose aree geografiche come: l'Europa, l'Oceania, l'Asia, l'Africa e gli Stati Uniti (Grizel et al., 1974; Perkins and Wolf, 1976; Comps et al., 1986; Moyer et al., 1993; Audemard et al., 2002; Elgharsalli et al., 2013; Adlard & Nolan, 2015) ed in numerose specie ospiti appartenenti alle famiglie Ostreidae, Mitilidae e Veneridae (tabella 1). Tuttavia, la presenza di *M. refringens* è stata registrata e confermata, mediante TEM ed analisi in PCR, esclusivamente nelle seguenti specie ospiti: *O. edulis*, lungo la costa europea atlantica e la costa europea mediterranea (Grizel et al., 1974), *Ostrea stentina*, lungo la costa mediterranea marocchina (Elgharsalli et al., 2013), *M. edulis* (Tigé e Rabouin 1976; Le Roux et al., 2001) ed *M. galloprovincialis*, lungo la costa atlantica europea e la costa mediterranea marocchina (Comps & Joly, 1980; Villalba et al., 1993b; Robledo et al., 1995a; López-Flores et al., 2004; Novoa et al., 2005), *X. securis* (Pasqual et al., 2010) e *S. marginatus* (López-Flores et al., 2008b), lungo la costa atlantica spagnola ed infine *C. gallina*, lungo la costa mediterranea spagnola (López-Flores et al., 2008a). Malgrado l'assenza della caratterizzazione biomolecolare, la presenza di differenti stadi di sviluppo, inclusi gli sporonti maturi con caratteristiche attribuibili a *M. refringens*, è stata registrata, esclusivamente mediante esame istologico in: *C. edule*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*, *Crassostrea virginica* (Berthe et al., 2004; López-Flores et al., 2008b). La presenza di *Marteilia* sp. è stata registrata in molte aree geografiche ed in numerose specie ospiti (Carrasco et al., 2015) ed in particolare in *Modiolus modiolus*, *C. edule* ed in *T. pullastra*, lungo la costa atlantica francese (Auffret & Poder, 1987; Poder et al., 1983), in *T. rhomboides*, lungo la costa atlantica francese e la costa atlantica spagnola (Poder et al., 1983), in *Ostrea puelchana* ed in *O. chilensis*, lungo la costa atlantica francese (Grizel et al., 1982; Pascual et al., 1991), in *O. angasi*, lungo la costa atlantica francese e la costa pacifica australiana (Bougrier et al., 1986), in *C. virginica* ed in *C. gigas*, lungo la costa atlantica francese (Renault et al., 1995; Montes et al., 1998), in *R. decussatus* ed in *Solen marginatus* lungo la costa atlantica spagnola (Villalba et al., 1993b; López & Darrida, 2006), in *Ensis minor* ed in

*E. siliqua*, lungo la costa adriatica italiana (Ceschia et al., 2001), in *Tridacna maxima*, lungo la costa delle isole Fiji (Norton et al., 1993), in *Saccostrea forskali*, nel Golfo della Thailandia (Taveekijakarn et al., 2002) ed infine in *Argopecten gibbus*, in Florida (Moyer et al., 1993).

Altre specie appartenenti al genere *Marteilia* sono state registrate in Europa ed in particolare, la specie *M. christiensi* è stata registrata in *Scrobicularia plana* lungo la costa atlantica francese (Comps, 1983), mentre recentemente, la specie *M. cochillia*, è stata registrata lungo la costa mediterranea (Carrasco et al., 2013a, 2013b) e la costa atlantica spagnola (Villalba et al., 2014).

In Asia, ed in particolare nel Sud Korea e nelle regioni Ovest del Giappone, la specie *M. chungmuensis* ha rappresentato una seria problematica per la produzione di *C. gigas*, *C. nippona* e *C. ariekensis* (Comps et al., 1986; Itoh et al., 2004a, 2004b; Limpanont et al., 2013), mentre la specie *M. granula* ha vincolato l'ostricoltura in Odawa bay, nell'Est del Giappone (Itoh et al., 2014). In Oceania, la specie *M. sydneyi* è stata responsabile di mortalità massive attribuite alla malattia QX in *S. glomerata*, lungo la costa australiana (Perkins & Wolf 1976; Green et al., 2011). La specie *M. lenghei* è stata descritta in *Saccostrea cucullata*, lungo la costa indiana australiana nonché nel Golfo Persico (Comps et al., 1986).

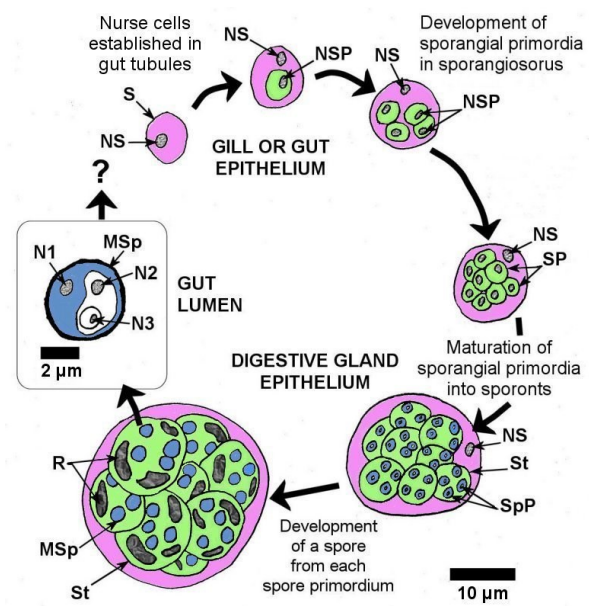
**Tabella 1** Specie ospiti, descrizione dell'area del primo segnalamento di *Marteilia* spp. (A: Atlantico; M: Mediterraneo; P: Pacifico; I: Indiano) (Carrasco et al., 2015)

SPECIE OSPITI	<i>Marteilia</i> spp.	ORIGINE/MARI ED OCEANI
<i>Ostrea edulis</i>	<i>M. refringens</i>	Europa A/M
<i>Ostrea stentina</i>	<i>M. refringens</i>	Tunisia M
<i>Ostrea puelchana</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>Ostrea angasi</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A/Australia P
<i>Ostrea chilensis</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>Saccostrea glomerata</i>	<i>M. syneyi</i>	Australia P/I
<i>Saccostrea echinata</i>	<i>Marteilioides</i> sp.	Australia I
<i>Saccostrea cucullata</i>	<i>Marteilia lenghei</i>	Golfo Persico I, Australia I
<i>Saccostrea forskali</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Tailandia P
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>C. gigas</i>	<i>M. chungmuensis</i>	Korea P
<i>C. virginica</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>C. nippona</i>	<i>M. chungmuensis</i>	Giappone P
<i>C. ariekensis</i>	<i>M. chungmuensis</i>	Korea P
<i>Pinctada margaritifera</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Australia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>M. refringens</i>	Europa A/Marocco M
<i>Mytilus edulis</i>		Europa A/Marocco M
<i>Modiolus modiolus</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>Xenostrobus securis</i>	<i>M. refringens</i>	Spagna A
<i>M. edulis</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Cina P
<i>Argopecten gibbus</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Florida (USA) A
<i>Scrobicularia piperata</i>	<i>Marteilia christiensi</i>	Francia A
<i>Tapes pullastra</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>Tapes rhomboides</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Francia/Spagna A
<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Spagna A
<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Giappone P
	<i>Marteilia granula</i>	Giappone P
<i>Tridacna maxima</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Fiji P
<i>Ensis minor/E. siliqua</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Italia M
	<i>Marteilia</i> sp.	Spagna A (Galizia)
<i>Solen marginatus</i>	<i>M. refringens</i>	Spagna A (Huelva)
<i>Chamalea gallina</i>	<i>M. refringens</i>	Spagna M
	<i>Marteilia</i> sp.	Francia A
<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Marteilia cochillia</i>	Spagna M/A

### 1.3 Sviluppo di *Marteilia* spp. nei molluchi bivalvi

Il ciclo vitale dei protozoi appartenenti alla classe *Paramyxia* è caratterizzato da un processo di sporulazione con gemmazione endogena e produzione di sporoplasmi racchiusi l'uno nell'altro (figura 1) (Desportes & Perkins 1990; Berthe et al., 2004). La proliferazione inizia a livello dei palpi labiali e delle branchie ed il primo stato di sviluppo è rappresentato da una cellula nutrice, uninucleata, con diametro pari a 5-8 µm, che si dispone alla base delle cellule epiteliali dei tubuli della ghiandola digerente, penetrando attraverso la membrana basale (Grizel et al., 1974). All'interno di un vacuolo citoplasmatico della cellula nutrice, avviene lo sviluppo di una cellula figlia uninucleata determinando la formazione dello Sporangiosoro o Cellula primaria. Quest'ultima, per scissione binaria interna, si divide, in un primo momento, in 4 cellule figlie secondarie o Sporangii primordiali con diametro pari a 12-30 µm, ciascuno con il proprio nucleo. Nel corso delle divisioni endocellulari avviene un concomitante aumento citoplasmatico delle cellule primarie per sostenere lo sviluppo di un numero crescente di cellule secondarie ed aumentare l'intensità dell'infezione (Franc, 1980; Grizel, 1985; Berthe et al., 2004). A seconda del numero di sporangii primordiali, la dimensione degli stadi di sviluppo primari varia da 7 a 35 µm (Grizel 1985).

**Figura 1** Rappresentazione schematica del processo della sporulazione di *Marteilia* spp. (S: cellula primaria, NS: nucleo della cellula primaria, SP: sporangi primordiali, NSP: nucleo dello sporangio primordiale, St: sporonte, SpP: spore primoriali, MSp: spora matura, R: corpi rifrangenti, N1: nucleo dello sporoplasma interno, N2: nucleo dello sporoplasma mediano, N3: nucleo dello sporoplasma esterno) (Bower, 2011)



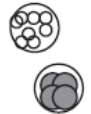


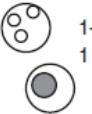

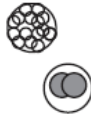
Come indicato in figura 2, il numero degli Sporangi primordiali è variabile a seconda della specie: sono 8 per *M. refringens*, *M. cochillia* e *M. granula*, da 8 a 16 per *M. sydneyi* e 3 per *M. chungmuensis* (Grizel et al., 1974; Perkins and Wolf, 1976; Comps, 1983; Itoh et al., 2014; Carrasco et al., 2003a). Gli Sporangi primordiali sembrano migrare dai tubuli digerenti primari ai secondari, tuttavia il processo alla base di tale migrazione non è ancora completamente conosciuto (Carrasco et al., 2015).

A livello dei tubuli digerenti primari e secondari, ogni Sporangio primordiale matura in uno Sporonte contenente Spore primordiali o Cellule terziarie, il cui numero è variabile a seconda della specie: sono 4 per *M. refringens* e *M. granula*, 2-3 per *M. sydneyi*, 6 per *M. cochillia* ed 1 per *M. chungmuensis* (Grizel et al., 1974; Perkins and Wolf, 1976; Comps, 1983; Itoh et al., 2014; Carrasco et al., 2003a) (figura 2). Le Spore primordiali maturano in Spore con diametro di 3,5-4,5 µm e le spore mature contengono 3 sporoplasmi comunemente a tutte specie apparteneti al genere *Marteilia* (Feist et al., 2009). Lo sporoplasma più esterno degenera, mentre quelli più interni si differenziano rispettivamente in cellule primarie e secondarie. In stadi avanzati d’infezione, i parassiti raggiungono dimensioni variabili da 30 a 40 µm (Berthe et al., 2004). Le spore mature di *M. refringens* sono circondate da una parete continua mentre quelle di *M. sydneyi* da membrane concentriche e quelle di *M. granula* da una caratterisca membrana elettrendensa che consente di discriminarla dalle altre specie appartenenti al genere *Marteilia* spp (Carrasco et al., 2015).

Esclusivamente per *M. refringens*, nello Sporonte maturo, le spore sono circondate da inclusioni eosinofile brillanti definite Corpi Rifrangenti che conferiscono il caratteristico nome alla specie (De Vico & Carella, 2012) e che sono indicatori del processo di sporulazione (Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE, 2015).

Nel corso del processo di sporulazione, le Spore mature sono emesse nel lume dei tubuli della ghiandola digerente e rilasciate nell’ambiente attraverso le feci, nel caso delle specie a tropismo per l’apparato digerente (Berthe et al., 1998) o nel lume dei tubuli gonadici, trattenute negli oociti, per le specie a tropismo per il tessuto gonadico (Itoh et al., 2002).

**Figura 2** Rappresentazione schematica delle caratteristiche morfologiche per discriminare le specie di *Marteilia* spp. (López & Darriba, 2006; Carrasco et al., 2013a; Itoh et al., 2014)

<i>M. refringens</i>	<i>Marteilia</i> sp. (Europe)	<i>M. cochillia</i>	<i>M. chungmuensis</i>	<i>Marteilia</i> sp. (Asia)	<i>M. sydneyi</i>
 8 2° cells 4 spores	 8 2° cells 6 spores	 4 2° cells 6 spores	 1-3 2° cells 1 spore	 4-8 2° cells 2 spores	 16 2° cells 2 spores

### 1.4 Ciclo vitale di *Marteilia* spp.

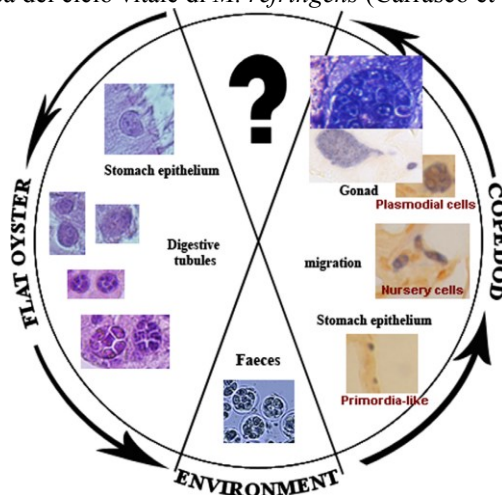
Il ciclo vitale di *Marteilia* spp. non è stato ancora completamente definito, tuttavia, numerosi studi confermano l’inesistenza di una trasmissione orizzontale del parassita, a favore dell’esistenza di un ciclo vitale eteroxeno (Grizel, 1979;

Berthe et al., 1998, 2004), dimostrando il coinvolgimento di altre specie ospiti nella trasmissione di *M. refringens* (Balouet et al., 1979; Grizel 1985; Lester 1986; Berthe et al., 1998). Pertanto, l'esito negativo dell'esposizione, *in vitro*, di individui di *M. galloprovincialis* ad una sospensione ottenuta per schiacciamento delle ghiandole digerenti di individui di *O. edulis* infetti a *M. refringens*, avvalorava l'assenza della trasmissione diretta del parassita (Comps & Joly 1980).

Studi riguardanti il meccanismo di trasmissione del parassita sono stati realizzati in particolari aree, definite "claires", contraddistinte da caratteristiche ambientali limitanti l'abbondanza di specie animali rispetto alle aree intertidali ed agli impianti di ostricoltura (Audemard et al., 2001), costituendo, pertanto, sistemi sperimentali ideali per l'identificazione dei potenziali ospiti intermedi del ciclo vitale di *M. refringens* (Ben-Horin et al., 2015).

Audemard et al. (2001, 2002), hanno dimostrato, tramite ibridazione *in situ* (ISH), il coinvolgimento del copepode *Paracartia grani* quale potenziale ospite intermedio nel ciclo vitale di *M. refringens* (figura 3), mediate il rilevamento del genoma del parassita, esclusivamente in individui femmina, nell'ovaio, ed in particolare all'interno degli ovociti, degli stadi giovanili ed adulti di *P. grani*. Tutti gli stadi di sviluppo di *P. grani* possono contribuire alla trasmissione del parassita (Boyer et al., 2013). È stata dimostrata la trasmissione di *M. refringens*, attraverso le feci, da individui di *O. edulis* infetti a *P. grani* (figura 3), tuttavia, non è stata ancora dimostrata la trasmissione del parassita da *P. grani* ad individui di *O. edulis* sani (Audemard et al., 2002; Carrasco et al., 2015). Ulteriori indagini dimostrano che *M. refringens*, tipo M, una volta ingerito da *P. grani*, non si moltiplica, contrariamente a *M. refringens*, tipo O, che una volta ingerito, migra dall'apparato digerente al tessuto gonadico del copepode (Carrasco et al., 2008a), dal quale è successivamente rilasciato (Boyer et al., 2013).

**Figura 3** Rappresentazione schematica del ciclo vitale di *M. refringens* (Carrasco et al., 2015)



La sporulazione è spesso responsabile della distruzione dell'epitelio della ghiandola digerente, a cui segue il rilascio degli sporonti nell'ambiente acquatico e la successiva ingestione ad opera del copepode *P. grani* (Audemard et al., 2002; Carrasco et al., 2008a; Boyer et al., 2013) (figura 3). Il parassita migra, attraverso i tessuti connettivi adiacenti, verso il tessuto gonadico del copepode dove forma pseudoplasmodi con un gran numero di cellule infettive di 2-5 µm (Carrasco et al., 2008a). Carrasco et al. (2007, 2008a) hanno dimostrato, mediante screening in PCR, la presenza del genoma di *M. refringens* ed il potenziale coinvolgimento di numerose specie zooplanctoniche, prelevate in baie naturali poco profonde, aree estuariali ed aree destinate alla mitilicoltura nel Delta dell'Ebro in Spagna, nel ciclo vitale del parassita. Pertanto, le specie vettrici di *M. refringens* planctoniche e bentoniche sono: i copepodi *Paracartia latisetosa*, *Paracartia discaudata*, *Paracartia clausi*, *Paracartia italica*, *Oithona* sp., *Euterpina acutifrons* e gli stadi larvali di decapodi Brachiuri, il nematode *Lineus gisseriesensis* ed il cnidaro *Cereus pendunculatus* (Audemard et al., 2002; Carrasco et al., 2007; Carrasco et al., 2008a).

Recentemente, Arzul et al. (2014) dimostra, mediante screening in PCR, la presenza del genoma di *Marteilia* spp. in numerosi taxa planctonici campionati nella Laguna Diana della Corsica, tuttavia, l'ISH ha permesso di confermare la presenza del genoma di *M. cochillia* esclusivamente in *P. latisetosa*, ed in particolare a livello del tessuto gonadico degli individui femmina, suggerendo il suo potenziale ruolo nel ciclo vitale del parassita. Adlard & Nolan (2015), riportano la presenza di stadi di sviluppo diversi di *M. syneyi*, in campioni di macrobenthos prelevati in Hawkesbury River, in Australia, dimostrando il coinvolgimento del polichete *Nephtys australiensis* nel ciclo vitale del parassita.

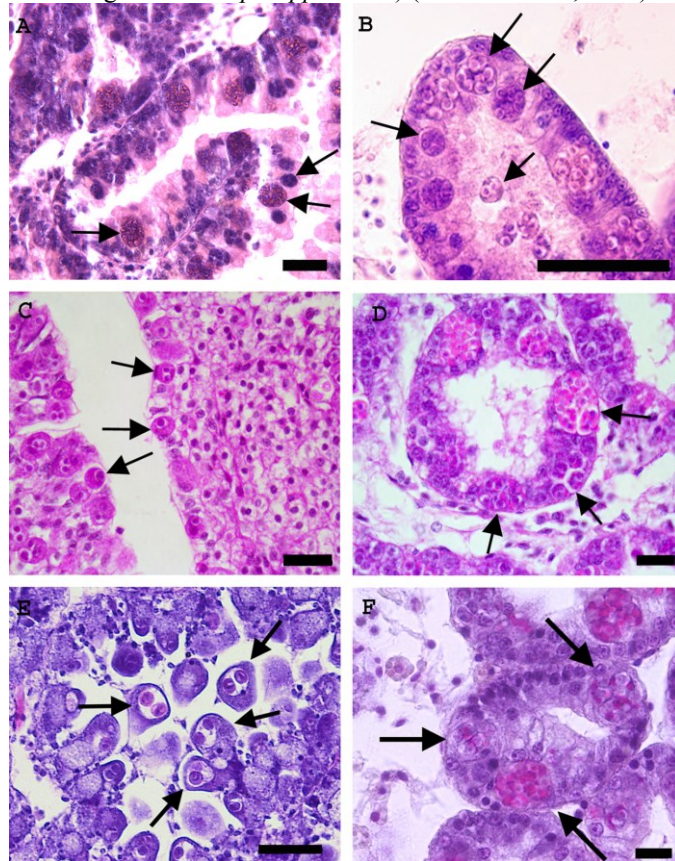
### 1.5 Organi bersaglio e meccanismo d'azione di *Marteilia* spp.

I protozoi appartenenti alla classe *Paramyxea* entrano in contatto con le specie ospiti attraverso la colonizzazione degli apparati digerente e riproduttivo (Berthe et al., 2004). In particolare, *M. refringens*, *M. sydneyi*, *M. cochillia* e *M. granula* presentano tropismo per la ghiandola digerente, mentre *M. chungmuensis* per il tessuto gonadico (figura 4) (Grizel et al., 1974; Perkins & Wolf, 1976; Audemard et al., 2002; Carrasco et al., 2013a; Itoh et al., 2014; Adlard & Nolan, 2015).



Tuttavia, gli stadi di sviluppo primari di *Marteilia* spp. sono stati rinvenuti anche in altri tessuti, come le branchie per *M. sydneyi* (Kleeman et al., 2002a; Green et al., 2011), l'intestino e lo stomaco per *M. granula* (Carrasco et al., 2015) ed il mantello, le branchie ed i palpi labiali per *M. chungmuensis* (Itoh et al., 2004a).

**Figura 4** Sezioni istologiche di *Marteilia* spp. (A: *M. refringens* nell'epitelio dei tubuli digerenti di *M. galloprovincialis*, barra di scala 50 µm; B: *M. conchillia* nell'epitelio dei tubuli digerenti di *C. edule*, barra di scala 100 µm; C: stadi di sviluppo primari di *M. sydneyi* nell'epitelio branchiale di *S. glomerata*, barra di scala 20 µm; D: *M. sydneyi* nell'epitelio dei tubuli digerenti di *S. glomerata*, barra di scala 40 µm; E: *M. chungmuensis* negli ovociti di *C. gigas*, barra di scala 30 µm; F: *M. granula* nell'epitelio dei tubuli digerenti di *R. philippinarum*) (Carrasco et al., 2015)



Durante il suo ciclo vitale, *M. refringens*, riconosce come organi bersaglio la ghiandola digerente dei molluschi bivalvi ed il tessuto gonadico dell'ospite intermedio, il copepode *P. grani* (Audemard et al., 2002). Gli stadi di sviluppo primari di *M. refringens*, sono solitamente localizzati nelle cellule epiteliali del tratto digerente superiore, come i palpi labiali e lo stomaco (Grizel et al., 1974) e, mediante ISH, sono stati osservati anche nell'epitelio delle lamelle branchiali di *M. galloprovincialis* (Carrasco et al., 2008b) e nel tessuto connettivo del mantello, nei palpi labiali e nell'epitelio branchiale di *M. edulis* (Garcia et al., 2009). Karagiannis & Angelidis (2007), hanno osservato mediante esame istologico, la presenza di cellule primarie uninucleate nelle cellule epiteliali dello stomaco e di sporangi nelle cellule epiteliali dei tubuli digerenti di *M. galloprovincialis*. Gli stessi autori, non hanno osservato la presenza del parassita a livello dell'epitelio branchiale, contrariamente a Robledo & Figueras (1995), che hanno descritto la presenza di *Marteilia* sp. in tale tessuto. Rayyan et al. (2006), hanno dimostrato in *M. galloprovincialis* la presenza concomitante di diversi stadi di sviluppo di *M. refringens*, nei tubuli della ghiandola digerente. Contrariamente, Perkins (1993), ha osservato la presenza abbondante di sporangi e sporonti e di poche cellule primarie uninucleate, ipotizzando che queste ultime, potrebbero moltiplicarsi massivamente solo nelle fasi iniziali dell'infezione, per poi differenziarsi negli stadi di sviluppo successivi. In caso di infezioni croniche di *Marteilia* spp., gli sporangi primordiali sono stati rinvenuti durante tutto l'anno mentre gli sporonti maturi, responsabili della trasmissione dell'infezione, solo stagionalmente, quando la temperatura dell'acqua risultava superiore a 17°C (Balouet, 1979).

In seguito ad infezione severa, *M. refringens* può interferire direttamente con i processi di filtrazione ed assorbimento (Berthe et al., 2004), sia in *O. edulis* che in *M. galloprovincialis* (Robledo & Figueras 1995; Villalba et al., 1997), dato che la sporulazione, provoca la distruzione degli epiteli dei tubuli digerenti, nel cui lume sono emesse le spore mature. Pertanto, la morte delle specie ospiti può essere attribuita sia all'ostruzione meccanica dei tubuli digerenti ad opera degli sporonti maturi che alla riduzione dell'acquisizione di energia (Wolf 1979). La ghiandola digerente rappresenta la sede della digestione intracellulare nonché dell'immagazzinamento delle riserve metaboliche ed è pertanto il principale organo bersaglio dei protozoi appartenenti al genere *Marteilia* (Berthe et al., 2004) che agiscono riducendo significativamente l'assorbimento di nutrienti da parte dei tessuti dell'ospite (Robledo et al., 1995b; Camacho et al. 1997) provocando una



conseguente riduzione dell'indice di condizione. Sono stati registrati anche l'impoverimento delle riserve di glicogeno in *O. edulis* (Robert et al., 1991) e l'alterazione della gametogenesi e dello sviluppo delle cellule del tessuto adipogranulare (ADH) in *M. galloprovincialis* ad opera di *M. refringens* (Villalba et al., 1993b).

La presenza di stadi di sviluppo primari, unitamente all'osservazione di alterazioni patologiche caratteristiche come la distruzione dell'epitelio dei tubuli digerenti, è indice di un'attiva infezione (Karagiannis & Angelidis, 2007). Malgrado, gli stadi di sviluppo primari di *M. sydneyi* siano stati rinvenuti, come per *M. refringens*, nelle cellule epiteliali di branchie e palpi labiali, gli stadi di sviluppo maturi di *M. sydneyi* mostrano una proliferazione extracellulare, responsabile della diffusione del parassita nei tessuti connettivi e nell'emolinfa, determinando, pertanto, una conseguente infezione sistemica dell'ospite (Kleeman et al., 2002a). La moltiplicazione degli stadi di sviluppo primari di *M. chungmuensis*, avviene nel tessuto connettivo (Itoh et al., 2004a) e la sporulazione nel tessuto gonadico, pertanto, la maturazione degli stadi avviene negli oociti (figura 4) (Itoh et al., 2002). Infine, Norton et al. (1993) descrivono una localizzazione atipica degli stadi di sviluppo maturi di *Marteilia* sp. osservati nel rene di *Tridacna maxima*.

## CAPITOLO II

### I fattori incidenti sulla trasmissione della Marteiliosi

#### 2.1 Fattori ambientali e zootecnici

Lo sviluppo di *Marteilia* spp., la manifestazione e la trasmissione dell'infezione sono influenzati da numerosi fattori abiotici (la temperatura e la sanità dell'acqua marina), biotici (il ciclo vitale ed il meccanismo di trasmissione del parassita, la presenza di ospiti intermedi, i meccanismi di difesa dell'ospite ed il tempo di esposizione dell'ospite al parassita) e zootecnici (area e sistemi di allevamento) (Grizel, 1985; Berthe et al., 2004; Karagiannis & Angelidis 2007) nonché dai livelli d'inquinamento ambientale e dall'idrodinamismo delle aree di allevamento (Robledo & Figueras, 1995). L'azione combinata dei fattori abiotici, biotici ed idrodinamici, rende complessa la previsione della diffusione degli agenti patogeni nell'ecosistema acquatico (Ben-Horin et al., 2015). Pertanto, la diffusione degli agenti patogeni tra molluschi bivalvi avviene passivamente mediante i venti e le maree (MacCready & Geyer, 2010) che veicolano una grande quantità di agenti patogeni e ne influenzano fortemente la dispersione (Narváez et al., 2012).

L'elevata salinità e l'intenso idrodinamismo potrebbero influenzare negativamente lo sviluppo di *M. refringens*, sebbene tali parametri agiscano in maniera meno significativa, rispetto alla temperatura, nella trasmissione dell'infezione (Audemard et al., 2001). Coerentemente, Ceschia et al. (1992), hanno riferito che l'elevata salinità inibisce la trasmissione della Marteiliosi ed in particolare Gombac et al. (2014) hanno registrato, in *M. galloprovincialis*, una riduzione della prevalenza d'infezione di *M. refringens* in Agosto, quando la salinità raggiunge valori elevati pari a 39g/L e la concentrazione di ossigeno disciolto si attesta su valori pari a 7,6 mg/L inferiori rispetto a quelli misurati durante l'inverno.

Relativamente all'incidenza delle caratteristiche dell'area di allevamento sulla trasmissione della Marteiliosi, Rayyan et al. (2006), hanno registrato una più elevata prevalenza d'infezione di *Marteilia* sp., pari a 24,5%, in mitili campionati in un'area sottoposta a maggior inquinamento rispetto ai dati registrati in altre aree di prelievo e pari a 12,2% e 7,1%. Analogamente, altri studi hanno riportato una maggiore prevalenza d'infezione di *Marteilia* spp. in mitili campionati in aree costiere poco profonde e con abbondante materiale organico (Fuentes et al., 1995; Robledo & Figueras, 1995). Al contrario, Bigas et al. (2000), hanno indicato l'assenza di relazione tra l'inquinamento dell'area di allevamento e la prevalenza del parassita. Altri studi hanno dimostrato che l'infezione di *M. sydneyi* in *S. glomerata* è fortemente influenzata dalla qualità dell'area di allevamento (Anderson et al., 1994; Wesche, 1995; Green & Barnes, 2010; Diggles, 2013), in quanto, l'abbondante materiale organico, derivante dalle attività agricole, nelle aree estuarine destinate all'ostricoltura, determina un incremento dell'incidenza dell'infezione. Pertanto, attualmente, la produzione di *S. glomerata* in Australia è sotto controllo da parte di Autorità locali competenti attraverso attività di tutela e gestione sostenibile dei fiumi (Carrasco et al., 2015).

Per quanto riguarda l'incidenza del sistema di allevamento sulla trasmissione della Marteiliosi, Karagiannis & Angelidis (2007), dimostrano una maggiore frequenza ed intensità d'infezione di *Marteilia* spp. in individui di *M. galloprovincialis* allevati su tavole rispetto a quelli allevati mediante filari galleggianti, in quanto la profondità di allevamento dei mitili sulle tavole, variabile tra 3-6 m e caratterizzata da temperature superiori a 17°C, favorisce lo sviluppo del parassita (Karagiannis & Angelidis, 2007). L'abbondanza degli ospiti intermedi nell'area di allevamento influenza fortemente la prevalenza d'infezione di *Marteilia* spp. (Diggles, 2013). In particolare, *P. grani* è particolarmente abbondante in aree costiere, estuarine ed ecosistemi semiconfinati caratterizzati dall'elevata disponibilità di alimento (Audemard et al., 2002), piuttosto che in zone a maggiore distanza dalla costa (Karagiannis & Angelidis, 2007).

#### 2.2 Temperatura e stagionalità della malattia

Lo sviluppo di *Marteilia* spp. la trasmissione e la manifestazione della Marteiliosi sono influenzati prevalentemente dalla temperatura dell'ambiente acquatico (Balouet et al., 1979; Berthe et al., 1998; Audemard et al., 2001; Carrasco et al., 2015). L'infezione di *Marteilia* spp. mostra un andamento stagionale, con un incremento della prevalenza durante i periodi primaverile ed estivo ed una diminuzione durante il periodo invernale (Grizel, 1985), dato che lo sviluppo e la sporulazione del parassita sono favoriti da temperature dell'acqua superiori a 17°C (Balouet, 1977; Grizel, 1985; Audemard et al., 2001), mentre le basse temperature invernali, non favoriscono il completamento dello sviluppo degli sporangi primordiali (Balouet 1979; Berthe et al., 1998).

L'incremento della prevalenza d'infezione di *M. refringens*, nei periodi primaverile ed estivo, è stata registrata sia in *O. edulis* che in *M. galloprovincialis* (Boyer et al., 2013), mentre, durante l'inverno ed all'inizio della primavera, la presenza del parassita è stata scarsamente registrata (Berthe et al., 2004).

La temperatura oltre ad incidere sulla trasmissione della Marteiliosi in maniera diretta, influenzando lo sviluppo di *Marteilia* spp., agisce anche in maniera indiretta, influenzando altri fattori e cicli biologici coinvolti nella trasmissione della malattia come la gametogenesi delle specie ospiti, la dinamica della popolazione zooplanctonica nonché la presenza di altri agenti patogeni presenti nell'area (Carrasco et al., 2015).

Il coinvolgimento di *P. grani* nel ciclo vitale di *M. refringens* è coerente con la fenologia del copepode e l'epizootologia dell'infezione (Carrasco et al., 2015). Il copepode è infatti particolarmente abbondante nei periodi primaverile ed estivo, coerentemente all'andamento stagionale che caratterizza l'infezione di *M. refringens* (Grizel 1985; Audemard et al., 2002). Durante il periodo primaverile avviene la schiusa delle uova bentoniche di *P. grani* che fungono così da serbatoio di *M.*

*refringens*, responsabile della trasmissione dell'infezione alla fine dell'estate ed all'inizio dell'autunno (Ben-Horin et al., 2015). A tal proposito, Boyer et al. (2013) hanno osservato, lungo la costa mediterranea francese, in primavera ed in autunno, un aumento dell'abbondanza di sporonti maturi di *M. refringens*, responsabili della trasmissione dell'infezione, in individui di *M. galloprovincialis*, ed una diminuzione durante l'estate, coerentemente con la stagionalità del ciclo vitale di *P. grani*.

La presenza degli sporonti maturi non è stata dimostrata durante il periodo invernale (Berthe et al., 2004), mentre, gli sporangi primordiali sono generalmente presenti durante tutto l'anno (Balouet 1979). Al contrario, alcuni studi hanno registrato la presenza degli sporonti maturi nel corso dell'intero anno (Villalba et al., 1993a; Robledo & Figueras, 1995), sostenendo che la dinamica del parassita nell'ambiente non sia ancora completamente nota (Carrasco et al., 2015). Inoltre, non è stata ancora dimostrata l'infettività degli sporonti maturi durante il periodo invernale né la conseguente trasmissione della malattia. D'altra parte, Carrasco et al. (2007), hanno rilevato, la presenza di sporangiosori con sporangi maturi nel 50% e nel 75% di mitili allevati in Spagna durante l'inverno e con una temperatura dell'acqua pari a 8°C. Tuttavia, in accordo con gli studi precedenti, non è stata osservata l'emissione delle spore mature nel lume dei tubuli digerenti nel mese di Gennaio e la prevalenza d'infezione registrata mostra valori bassi pari a 3,34% (Carrasco et al., 2007).

Nelle acque europee e nord africane il periodo ottimale per lo sviluppo di *Marteilia* spp. è compreso tra Maggio e Settembre, tuttavia, a causa delle elevate temperature raggiunte dalle acque mediterranee, lo sviluppo del parassita e la trasmissione dell'infezione avvengono principalmente tra la tarda primavera e l'inizio estate ed in autunno (Boyer et al., 2013). Pertanto, in Europa sono stati registrati picchi d'infezione tra i mesi di Giugno ed Agosto, con una riduzione a Dicembre (Grizel 1985; Audemard et al., 2001), in particolare, la presenza di *Marteilia* spp. è stata registrata in Spagna da Febbraio ad Ottobre (Carrasco et al., 2008), in Grecia da Maggio a Novembre (Photis et al., 1997), in Croazia nel mese di Agosto (Zrnčić et al., 2001) ed in Italia ad Aprile e dal mese di Giugno a Settembre (Ceschia et al., 1992).

Pëllumb et al. (2006), hanno registrato nell'Aprile dell'anno 2005 una prevalenza d'infezione di *Marteilia* spp. in individui di *M. galloprovincialis* allevati in tre diverse aree nella Laguna di Butrinti (Albania meridionale) pari a 19,3% all'esame citologico e al 10% all'esame istologico, con temperature dell'acqua comprese tra 25-26°C. Tuttavia, nel Giugno dell'anno precedente, gli stessi autori, non hanno registrato la presenza del parassita in nessuna delle aree monitorate. Karagiannis & Angelidis (2007) hanno riportato una prevalenza massima d'infezione di *Marteilia* sp. nel mese di Luglio, e pari a 36,7%, con temperatura dell'acqua pari a 29°C rispetto ai valori registrati ad Ottobre, pari a 20%, e con temperatura dell'acqua pari a 16°C. Coerentemente, nell'emisfero australe, l'infezione di *M. sydneyi* è più frequente da Gennaio ad Aprile quando le temperature sono più elevate (Wesche et al., 1999), con un picco a Febbraio (Peters & Raftos, 2003) mentre, gli eventi di mortalità sono stati registrati tra Aprile e Giugno (Carrasco et al., 2015). L'infezione attribuita a *M. cochillia* è stata responsabile di mortalità massive in popolazioni di *C. edule* lungo la costa mediterranea della Spagna, nel Delta dell'Ebro, in Catalogna nell'Agosto dell'anno 2008, con temperature dell'acqua particolarmente elevate e pari a 29°C (Carrasco et al., 2013a, 2013b). La stessa specie è stata identificata anche lungo la costa atlantica della Spagna a Ria de Arousa, in Galizia nel Febbraio 2012, dove ha provocato mortalità pari al 100% ad Aprile e Maggio (Villalba et al., 2014). In Italia ed in particolare nel Mar Adriatico settentrionale, la *Marteilia* è stata registrata alla fine della primavera (Pëllumb et al., 2006), mentre nel Mar Tirreno, nei mesi di Giugno, Luglio e Settembre (Carella et al., 2010). Gombac et al. (2014), hanno registrato una maggiore prevalenza d'infezione di *M. refringens* in popolazioni di *M. galloprovincialis* allevati nel Mare di Slovenia durante i mesi di Dicembre, Gennaio e Febbraio, con temperatura inferiore a 17°C e pari a 9,1°C, rispetto alla prevalenza d'infezione registrata ad Agosto con temperatura pari a 24,1°C. Infine, relativamente alla specie *M. granula*, sebbene, siano ancora scarsi i dati disponibili, sembra che l'infezione si manifesti prevalentemente nel periodo invernale piuttosto che in quello estivo (Carrasco et al., 2015).

### 2.3 Patogenicità ed interazione ospite-parassita

Il manifestarsi di un evento morboso di natura infettiva è influenzato fortemente dall'interazione ospite-agente patogeno che, a sua volta, è regolata da caratteristiche intrinseche dell'ospite, quali i meccanismi di difesa immunitaria e da caratteristiche intrinseche dell'agente patogeno, come la virulenza (Ben-Horin et al., 2015). La trasmissione e l'impatto delle infezioni nei molluschi bivalvi sono influenzate significativamente dai fattori abiotici, che influenzano il successo dell'infezione, dalle complesse interazioni ecologiche, quali la predazione e la diffusione degli stadi di sviluppo degli agenti patogeni ad opera di specie che non siano ospiti, nonché dall'azione intereferente tra agenti patogeni di diversa natura, potenzialmente in grado di attenuare lo sviluppo delle malattie (Dobson 2004; Hall et al., 2007).

I molluschi bivalvi possiedono strutture ciliate branchiali in grado di filtrare, in modo efficiente, il particolato sospeso in acqua (Jorgensen, 1996), realizzandone contemporaneamente la cernita, la selezione, l'elaborazione, il rifiuto, l'ingestione ed il trasporto (Shumway, 1985; Riisgard & Larsen, 1995; Ward & Shumway, 2004) ai palpi labiali, alla bocca e successivamente allo stomaco, dove è sottoposto a rottura meccanica ed al mescolamento con enzimi digestivi (Shimeta & Jumar, 1991; Ward & Shumway, 2004). Dato che, nella maggior parte dei casi, la trasmissione degli agenti di natura infettiva tra i molluschi bivalvi avviene attraverso la filtrazione del materiale in sospensione e raramente per contatto diretto, gli agenti patogeni, per sviluppare l'infezione, devono, in primo luogo, sopravvivere e mantenere la virulenza nell'ambiente esterno ed una volta raggiunto l'ospite, superare i meccanismi di selezione del particolato (Ben-Horin et al., 2015). Una volta entrati nell'ospite, gli agenti patogeni devono resistere ai processi digestivi meccanici e chimici nonché superare i meccanismi di difesa basati, nei molluschi bivalvi, sull'immunità di tipo innato (Canesi et al., 2002; Zhang et al., 2015). I protozoi, in quanto parassiti obbligati, necessitano di ospiti per completare il ciclo vitale, pertanto la loro virulenza

è correlata: al tempo di sopravvivenza al di fuori dell'ospite (Chu & Lund, 2006), all'impiego di meccanismi per eludere il sistema immunitario dell'ospite (Hughes et al., 2010) ed alla capacità di sviluppare infezioni croniche diffondendo dai tessuti dell'ospite all'ambiente acquatico (Bushek et al., 2002). Grizel (1985) ha suggerito che le spore di *M. refringens* necessitano di un periodo di maturazione in acqua o nei sedimenti marini prima di manifestare la virulenza.

Nei molluschi bivalvi le funzioni digerenti ed immunitarie sono fortemente correlate. A tal proposito, la sede principale della digestione intracellulare è la ghiandola digerente (Brillant & MacDonald, 2000, 2003) dove, gli emociti circolanti fagocitano sia il particolato che è successivamente trasferito, attraverso mucosa intestinale, ad altri tessuti per essere assimilato (Canesi et al., 2002; Wootton et al., 2003), sia agenti patogeni di natura virale, batterica e parassitaria presenti nell'intestino o nell'emolinfa (Hine, 1999). Pertanto, l'inattivazione e l'eliminazione degli agenti patogeni è data dall'azione coordinata degli emociti e dei meccanismi di difesa umorale quali. agglutinine, enzimi lisosomiali, intermedi tossici dell'ossigeno e vari peptidi antimicrobici (Hine, 1999; Canesi et al., 2002; Canesi et al., 2013). Dato che i molluschi bivalvi hanno un sistema circolatorio di tipo aperto, i meccanismi di difesa non hanno luogo esclusivamente nel tratto digerente ma in tutti i tessuti nonché nel fluido extrapalleale (Allam & Paillard, 1998; Hine, 1999). Tuttavia, i parassiti dei molluschi bivalvi hanno sviluppato numerose strategie adattative per eludere i meccanismi di difesa degli ospiti. La maggior parte dei protozoi evita i processi di selezione del particolato e della digestione sviluppando l'infezione a livello delle branchie (Ben-Horin et al., 2015), dei sifoni e delle branchie (Dahl et al., 2010), nonché attraverso la membrana basale dell'intestino (Hine, 1991). Gli stadi di sviluppo primari di *M. refringens* e *M. sydneyi* si moltiplicano a livello dei palpi labiali e dell'epitelio branchiale (Audemard et al., 2002; Kleeman et al., 2002) e nel corso delle divisioni endocellulari si verifica un concomitante aumento citoplasmatico delle cellule primarie finalizzato a sostenere lo sviluppo di un numero crescente di cellule secondarie ed aumentarne l'intensità dell'infezione (Grizel, 1985; Berthe et al., 2004).

## 2.4 Sensibilità delle specie ospiti

L'adattamento dei molluschi bivalvi alle caratteristiche ambientali dell'area di allevamento, influenza in maniera rilevante la sensibilità all'infezione (Carrasco et al., 2015). Coerentemente, Fuentes et al. (2002) hanno descritto una diversa sensibilità all'infezione di *Marteilia* spp. in popolazioni di mitili geneticamente diverse, in particolare, popolazioni ibride di *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, localizzate in un'area endemica per *Marteilia* spp. hanno mostrato una ridotta vitalità, nonché livelli inferiori di proteine da shock termico (HSP70) e della proteina da stress calreticulina, rispetto alle popolazioni di *M. galloprovincialis* native.

Anche l'età delle specie ospiti influenza la prevalenza e l'intensità dell'infezione di *M. refringens*, risultando maggiori in individui aventi 2 anni di vita ed oltre (Audemard et al., 2001; Villalba et al., 1993b), malgrado la presenza del parassita sia stata registrata in tutti gli stadi di sviluppo (Grizel, 1985).

L'effetto dell'immunosoppressione sulla trasmissione di *Marteilia* spp. è stato scarsamente investigato. Tuttavia Gombac et al. (2014), hanno ipotizzato la maggiore sensibilità all'infezione di individui di *M. galloprovincialis* allevati dovuta a fattori stressanti di natura zootecnica, come le operazioni di incalzo, la pulizia e la ridistribuzione in calze più grandi a metà del ciclo di produzione. La sensibilità all'infezione di *Marteilia* spp. può essere influenzata, in *M. galloprovincialis*, anche dallo stadio gonadico, in quanto lo stress derivante dall'emissione gametica, contribuisce alla trasmissione della malattia (Villalba et al., 1993b).

Karagiannis & Angelidis (2007) hanno ipotizzato l'esistenza di una relazione tra la prevalenza e l'intensità dell'infezione di *Marteilia* spp. e l'immunosoppressione in *M. galloprovincialis* dovuta a stress indotto dalle elevate temperature pari a 29-32°C e dal ridotto livello di ossigeno disciolto (Galinou-Mitsoudi & Petridis, 2000).

Altri autori hanno riportato che la riduzione della sanilità determina immunosoppressione in *S. glomerata* che risulta maggiormente sensibile all'infezione di *M. sydneyi* (Butt et al., 2006; Butt and Raftos, 2007). Per la stessa specie ospite, Peters & Raftos (2003) hanno attribuito, la significativa riduzione dei livelli di proteina phenyloxidasica (PO), all'infezione di *M. sydneyi* dimostrando la compromissione del sistema immunitario dell'ospite indotta dal parassita.

## CAPITOLO III

### Rilevanza socio-economica della Marteiliosi

#### 3.1 Mortalità e morbosità

Alla fine degli anni '60 ed all'inizio degli anni '70, l'infezione di *M. refringens*, congiuntamente alla trasmissione di *B. ostreae*, ha esercitato un grave impatto socio-economico in allevamenti di *O. edulis* danneggiando fortemente l'ostricoltura francese (Grizel et al., 1974).

Negli anni successivi, anche in altri paesi europei come la Spagna, l'Italia ed il Portogallo sono state registrate riduzioni delle produzioni di ostriche attribuite ai suddetti patogeni (Villalba et al., 1992; Ceschia et al., 1992), determinando la quasi completa sostituzione della specie *O. edulis* a favore di *C. gigas*, caratterizzata da una maggiore resistenza a *Marteilia* spp. e *Bonamia* spp., da un alto grado di adattamento e da buoni risultati in termini di produzione. Nelle ostriche *M. refringens* è un agente patogeno letale che provoca la morte durante il secondo anno successivo al primo contatto con l'agente patogeno (Alderman, 1979; Audermard et al., 2002; Grizel et al., 1974) con tassi di mortalità pari al 50-90% registrati durante i periodi estivi ed autunnali (Grizel, 1985; Grizel et al., 1974).

Tra le altre specie responsabili di mortalità massive, la specie *M. cochillia* ha provocato recentemente mortalità pari a 90-100% in allevamenti di *C. edule*, lungo le costa mediterranea (Carrasco et al., 2013a) e la costa atlantica della Spagna (Villalba et al., 2014), esercitando un impatto negativo sia dal punto di vista socio-economico che ecologico, rappresentando una minaccia per la biodiversità dei banchi naturali (Carrasco et al., 2015). Elevati tassi di mortalità, pari a l'80%, sono stati registrati in allevamenti di *S. glomerata* attribuiti all'infezione da *M. sydneyi* (Berthe et al., 2004). Malgrado siano stati osservati maggiormente effetti subletali, indotti da *M. refringens*, ed influenzanti la mitilicoltura dal punto di vista produttivo, sono stati registrati tassi di mortalità superiori al 40% (Villalba et al., 1993b; Thébault et al., 1999; Berthe et al., 2004).

#### 3.2 Segni clinici della Marteiliosi

I segni clinici dell'infezione di *M. refringens*, in considerazione della loro aspecificità, non sono spesso rilevati facilmente (Auffret & Poder 1985; Grizel et al 1974; Alderman 1979; Grizel 1985) anche in caso di severe infezioni (Berthe et al., 2004). In particolare, i segni clinici dell'infezione di *M. refringens* in *O. edulis* consistono: nel pallore della ghiandola digerente, che appare giallastra ed atrofica, nell'emaciazione e colliquazione del mantello, che appare traslucido e nella riduzione del tasso di crescita (Grizel et al., 1974; Grizel, 1985; Berthe et al., 2004). I segni clinici dell'infezione di *M. refringens* in *M. galloprovincialis* consistono: nella riduzione del tasso di crescita, nella riduzione degli indici di condizione e gonadico e nell'inibizione dello sviluppo gonadico (Villalba et al., 1993a, Fuentes et al., 1995). Le alterazioni dei processi di filtrazione ed assorbimento dei nutrienti, indotte dall'infezione di *M. refringens* sono alla base della riduzione dell'indice di condizione e dell'emaciazione del mantello che a sua volta provoca, nelle fasi terminali dell'infezione, la comparsa delle valve beanti (Berthe et al., 2004).

Altre specie esercitano un impatto negativo sulla molluschicoltura mediante la riduzione della qualità merceologica del prodotto allevato. In particolare, *M. chungensis* determina, in *C. gigas*, l'ingrossamento anormale del tessuto gonadico (Abnormal Enlargement of Ovary) e la presenza di formazioni nodulari a livello palleale, con conseguente riduzione del valore commerciale, malgrado l'infezione attribuita a tale specie non sia associata ad un'elevato tasso di mortalità (Imanaka et al., 2001). Inoltre l'elevata prevalenza d'infezione di *M. chungensis*, pari al 50%, registrata durante il periodo della raccolta, unitamente all'inibizione dell'emissione gametica (Ngo et al., 2003), ha provocato gravi perdite economiche nel Sud Korea e nelle regioni Ovest del Giappone (Carrasco et al., 2015).

#### 3.3 Studi di monitoraggio

Le attività di monitoraggio relative alla Marteiliosi sono state realizzate sia al fine di ottemperare alle richieste della normativa vigente che per ottenere informazioni riguardanti la distribuzione e la trasmissione di una malattia problematica per la molluschicoltura e potenzialmente in grado di esercitare gravi impatti socio-economici. Pertanto, i paesi che hanno riposto maggiore interesse verso il monitoraggio della Marteiliosi sono quelli in cui la mitilicoltura rappresenta un'importante voce produttiva ed in particolare: la Spagna, la Francia e la Grecia.

Nello specifico, nel Golfo Thermaikos in Grecia, Virvilis et al. (2003) hanno registrato in *M. galloprovincialis* una prevalenza d'infezione attribuita a *Marteilia* spp. pari a 21,25% e successivamente, nella stessa area, Rayyan et al. (2006) hanno riportato una prevalenza pari a 14,6% in campioni di *M. galloprovincialis* prelevati in tre diversi allevamenti. Infine, Karagiannis & Angelidis (2007), nel Golfo Thermaikos, hanno registrato prevalenze d'infezione variabili tra 20-10% e 36,7-10%, in campioni di *M. galloprovincialis* prelevati rispettivamente ad Ottobre e Luglio.

Le prevalenze dell'infezione di *Marteilia* spp., registrate in allevamenti di *M. galloprovincialis* in Spagna nel Delta dell'Ebro, variano da 1,67% a 26,67% (Carrasco et al., 2007, 2008), coerentemente Robledo e Figueras (1995) hanno registrato in Galizia, prevalenze variabili da 5,5% a 38,5%.

Le maggiori prevalenze d'infezione, variabili da 37% al 70%, sono state registrate in allevamenti francesi di *M. galloprovincialis* nel nord della Bretagna (Auffret & Poder 1983).

Gli studi di monitoraggio della Marteiliosi sono stati condotti anche in altre aree del bacino del Mediterraneo. In particolare, Pëllumb et al. (2006) hanno registrato prevalenze d'infezione, in allevamenti di *M. galloprovincialis* nella Laguna di Butrinti in Albania, pari a 19,3% all'esame citologico ed al 10% all'esame istologico, mentre Zrnic et al. (2001) hanno riportato, in Croazia, una prevalenza d'infezione pari al 5%.

In Italia, soltanto in pochi studi è stata eseguita l'identificazione del parassita a livello di specie, dimostrando l'infezione di *M. refringens* in *M. galloprovincialis* nel Golfo della Spezia (Balseiro et al., 2007) e nel Golfo di Napoli e nel Golfo di Salerno (Carella et al., 2010). Ceschia et al. (1992) hanno registrato nel Mare Adriatico prevalenze d'infezione di *Marteilia* spp. variabili da 16,6% a 22,2%. Nell'ultimo decennio, le attività di monitoraggio condotte nelle mitilicoltura italiane hanno permesso di registrare valori di prevalenza d'infezione molto basse o l'assenza del parassita. In particolare nell'alto Adriatico, nelle Regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto ed Emilia Romagna sono state riportate prevalenze d'infezione vicine all'1% (Gombac et al., 2014). Nel Golfo di Trieste, nel 2004, è stata registrata una prevalenza d'infezione pari a 1,25%, mentre, nel corso dell'anno successivo, non è stata rinvenuta la presenza del parassita, infine tra il 2007 ed il 2008 è stata riportata una prevalenza d'infezione pari a 0,3%. Nella Laguna di Venezia, nel 2003, è stata riportata una prevalenza d'infezione pari a 0,01% mentre nel 2004 e nel 2005, non è stata registrata la presenza di *Marteilia* spp. (Gombac et al., 2014). Prevalenze d'infezione leggermente superiori sono state registrate nel Mar Tirreno: 2,77% e 5,82% rispettivamente nel 2002 e nel 2003 nelle mitilicoltura liguri (Ercolini et al., 2004) e 15% e 25% in banchi naturali ed in allevamenti di *M. galloprovincialis* nei Golfi di Napoli e Salerno sono rispettivamente (Carella et al., 2010).



## CAPITOLO IV

### Le malattie notificabili

#### 4.1 Quadro normativo: dal primo atto legislativo ad oggi

Le malattie dei molluschi bivalvi sono state oggetto d'interesse da parte dell'U.E. che ha emanato molte norme legislative al riguardo. Il primo atto legislativo comunitario è stata la Direttiva del Consiglio 91/67/CEE del 28.01.1991, recepita in Italia con il D.P.R. 30 Dicembre 1992, n. 555, mediante il quale anche in Italia sono state poste le basi per la gestione degli aspetti riguardanti la sanità animale anche nel settore acquatico (De Vico & Carrella, 2012), attraverso la regolamentazione degli spostamenti degli animali acquatici tra zone aventi uguale stato sanitario relativamente alle malattie elencate nell'elenco II dell'allegato A. Le malattie elencate nell'elenco II dell'allegato A del D.P.R. 555/92 sono sostenute dagli agenti eziologici: *B. ostreae*, *Marteilia* sp., *Haplosporidium* sp. e *Perkinsus* sp. ma con la successiva emanazione del D.M. del 29 Gennaio 1997 e l'applicazione delle Direttive 93/54/CEE e 95/22/CE, sono state elencate esclusivamente le malattie sostenute da *Bonamia ostreae* e *Marteilia refringens*. La Direttiva del Consiglio 95/70/CEE del 22.12.1995, recepita in Italia con il D.P.R. 20 ottobre 1998 n. 395 ha permesso l'istituzione di laboratori di riferimento nazionali, coordinati da un laboratorio di riferimento designato dall'U.E. e corrispondente al laboratorio dell'IFREMER, Centro di riferimento comunitario delle malattie dei molluschi con sede a La Tremblade (Francia). Le malattie e le relative specie ospiti normate dall'ultimo atto legislativo ed elencate nell'allegato D della Direttiva 95/70/CEE sono state integrate a quelle elencate nell'allegato A del D.P.R. 555/92. L'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE) è un'organizzazione intergovernativa, nata attraverso l'accordo internazionale del 25 Gennaio 1924 ed avente tra gli obiettivi, la conoscenza delle malattie infettive degli animali acquatici e l'attuazione di misure sanitarie finalizzate a prevenirne la diffusione. Inizialmente, è stata designata come Ufficio Internazionale delle Epizozie, ed ha ottenuto nel Maggio 2003 la denominazione attuale, raggiungendo nell'anno 2014 un totale di 180 Paesi membri. I metodi per la diagnosi delle malattie degli animali acquatici sono descritti nel Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE, mentre il Codice Sanitario per gli Animali Acquatici OIE riporta le modalità di campionamento ed altre informazioni utili per la corretta gestione degli eventi morbosi.

Attualmente, gli aspetti sanitari di pesci, molluschi e crostacei sono regolamentati dalla Direttiva 2006/88/CE recepita in Italia con il Decreto Legislativo 4 agosto 2008, n. 148 "Attuazione della Direttiva 2006/88/CE relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie".

La direttiva 2006/88/CE stabilisce le prescrizioni specifiche relative ai programmi di sorveglianza sanitaria e di eradicazione, ai metodi di campionamento e diagnostici, applicate da tutti gli Stati membri, per le malattie elencate nell'allegato IV, parte II. Tale allegato, malgrado riporti alcune delle malattie notificabili enunciate nei precedenti atti normativi, specifica un maggior numero di specie ospiti sensibili a tali malattie inserendo per la *M. refringens* anche le specie *M. edulis* e *M. galloprovincialis*. La direttiva 2006/88/CE stabilisce le prescrizioni da rispettare affinché gli Stati membri e loro zone o compartimenti ottengano lo status di indenne dalle suddette malattie, fondando sul principio che, in tutti i Paesi membri, sia l'eradicazione delle malattie elencate nell'allegato IV, parte II che l'ottenimento dell'indennità da tali malattie dovrebbero fondarsi sugli stessi principi e sull'identico approccio scientifico.

#### 4.2 Malattie notificabili dei molluschi bivalvi e sorveglianza sanitaria

Le malattie notificabili dei molluschi bivalvi sono elencate nell'allegato IV parte II del D.Lgs n. 148/2008 che classifica le malattie esotiche, attribuite agli agenti eziologici *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus marinus* e *Microcytos mackini*, e le malattie non esotiche, sostenute dagli agenti eziologici *Bonamia ostreae* e *Marteilia refringens*, associate rispettivamente ad un elenco di specie ospiti sensibili (tabella 2).

**Tabella 2** Malattie notificabili dei molluschi e relative specie ospiti sensibili (allegato IV parte II del D.Lgs n. 148/2008)

MALATTIE ESOTICHE	
MALATTIA	SPECIE SENSIBILI
Infezione da <i>Bonamia exitiosa</i>	Ostrica piatta australiana ( <i>Ostrea angasi</i> ) e ostrica cilena ( <i>Ostrea chilensis</i> )
Infezione da <i>Perkinsus marinus</i>	Ostrica giapponese ( <i>Crassostrea gigas</i> ) e ostrica della Virginia ( <i>Crassostrea virginica</i> )
Infezione da <i>Microcytos mackini</i>	Ostrica giapponese ( <i>Crassostrea gigas</i> ), ostrica della Virginia ( <i>Crassostrea virginica</i> ), ostrica di Olimpia ( <i>Ostrea conchaphila</i> ) e ostrica piatta europea ( <i>Ostrea edulis</i> )
MALATTIE NON ESOTICHE	
MALATTIA	SPECIE SENSIBILI
Infezione da <i>Marteilia refringens</i>	Ostrica piatta australiana ( <i>Ostrea angasi</i> ), ostrica cilena ( <i>O. chilensis</i> ), ostrica piatta europea ( <i>O. edulis</i> ), ostrica argentina ( <i>O. puelchana</i> ), mitilo ( <i>Mytilus edulis</i> ) e mitilo mediterraneo ( <i>M. galloprovincialis</i> )
Infezione da <i>Bonamia ostreae</i>	Ostrica piatta australiana ( <i>O. angasi</i> ), ostrica cilena ( <i>O. chilensis</i> ), ostrica di Olimpia ( <i>O. conchaphila</i> ), ostrica asiatica ( <i>O. danselamellosa</i> ), ostrica piatta europea ( <i>O. edulis</i> ), ostrica argentina ( <i>O. puelchana</i> )

Le malattie sostenute dai suddetti agenti eziologici, rappresentando una grave problematica per la molluschicoltura mondiale, devono essere notificate all'Azienda sanitaria locale, competente per territorio che adotta specifiche misure di contenimento. Le malattie notificabili, elencate nell'allegato IV parte II del D.Lgs n. 148/2008, sono inoltre incluse nel Manuale per la Diagnosi delle Malattie degli Animali Acquatici (2015), e sono pertanto, elencate tra le malattie notificabili dall'OIE (OIE, 2015). Il D.Lgs n. 148/2008 prevede che tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura siano categorizzate dal punto di vista sanitario per ogni malattia notificabile non esotica. A tal proposito, l'allegato III, parte A, propone un criterio per classificare lo stato sanitario delle aziende e delle zone destinate alla molluschicoltura attraverso 5 categorie (tabella 3).

**Tabella 3** Categorie e stato sanitario (allegato III del D.Lgs n. 148/2008)

CATEGORIA	STATO SANITARIO
I	Indenne da malattia (art. 46, art. 47)
II	In programma di sorveglianza (art. 41, comma 1)
III	Indeterminato, non notoriamente infetto ma non soggetto ad un programma per l'ottenimento dello stato di indenne da malattia
IV	In programma di eradicazione (art. 41, comma 5)
V	Infetto (art. 37)

La categorizzazione sanitaria è finalizzata alla corretta gestione delle movimentazioni degli animali d'acquacoltura tra le aziende e le zone destinate a molluschicoltura, la cui introduzione, ai sensi dell'articolo 13 del D.Lgs n. 148/2008, in un determinato luogo di destinazione, non deve compromettere lo stato sanitario degli animali ivi presenti. Pertanto, gli animali d'acquacoltura introdotti in un'azienda o una zona destinata alla molluschicoltura ricevente devono provenire obbligatoriamente da un'azienda o da una zona destinata alla molluschicoltura di pari o superiore stato sanitario (tabella 4). Inoltre, in ottemperanza all'articolo 9 del D.Lgs n. 148/2008, tutte le imprese d'acquacoltura comprese le zone destinate alla molluschicoltura, devono garantire la rintracciabilità delle movimentazione degli animali mediante registrazione degli spostamenti in entrate ed uscita, delle mortalità nonché dei risultati del programma di sorveglianza sanitaria.

**Tabella 4** Norme per l'immissione sul mercato degli animali d'acquacoltura (art. 12, 13, allegato III, parte A del D.Lgs n. 148/2008)

CATEGORIA	STATO SANITARIO	APPROVVIGIONAMENTO ANIMALI	DESTINAZIONE ANIMALI
I	Indenne	Solo da categoria I	Tutte le categorie
II	In programma di sorveglianza	Solo da categoria I	Categorie III e V
III	Indeterminato	Categorie I, II, III	Categorie III e V
IV	In programma di eradicazione	Solo da categoria I	Solo categoria V
V	Infetto	Tutte le categorie	Solo categoria V

In ottemperanza agli articoli 4 e 6 del D.Lgs n. 148/2008, devono essere autorizzate a condizione che soddisfino i requisiti di rintracciabilità delle movimentazioni degli animali d'acquacoltura (art. 9), di buone prassi in materia di igiene (art.10) e sia predisposto un programma di sorveglianza sanitaria basato sulla valutazione del rischio di contrarre e diffondere le malattie soggette a notifica. Ai sensi dell'articolo 11 del D.Lgs n. 148/2008, le finalità del programma di sorveglianza sanitaria consistono nel rilevare:

- un eventuale aumento del tasso di mortalità nelle aziende, nelle zone e nelle zone destinate a molluschicoltura in funzione del tipo di produzione;*
- la presenza delle malattie elencate nell'allegato IV, parte II, in aziende, zone e zone destinate a molluschicoltura in cui siano presenti specie animali sensibili a tali malattie.*

La frequenza delle ispezioni in aziende e zone destinate a molluschicoltura raccomandata dall'autorità competente (art. 8), e la frequenza delle ispezioni raccomandata dai servizi sanitari qualificati per gli animali acquatici (art. 11), nonché il tipo di sorveglianza sanitaria raccomandata nel corso delle ispezioni, sono stabilite dall'allegato III, parte B del D.Lgs n. 148/2008 (tabella 9) e derivano:

- dalla presenza di specie sensibili alle malattie notificabili;
- dallo stato sanitario;
- dal livello di rischio nel contrarre e diffondere la malattie notificabili.

Il rischio di contrarre e diffondere le malattie notificabili è valutato sulla base dei parametri: acqua ed animali d'acquacoltura e, nello specifico, la valutazione del rischio deriva dall'approvvigionamento idrico, dallo smaltimento delle acque reflue di allevamento, dalla provenienza e destinazione degli animali d'acquacoltura (tabelle 5-8).

L'allegato III, parte B del D.Lgs n. 148/2008, indica che un'azienda o zona destinata a molluschicoltura ha un rischio elevato di contrarre e diffondere le malattie notificabili, se le condizioni di allevamento, come un'elevata biomassa ed una scarsa qualità dell'acqua, siano tali da aumentare il rischio di malattia e se gli animali siano destinati all'allevamento o al ripopolamento. Invece, un'azienda o zona destinata a molluschicoltura ha un rischio medio di contrarre e diffondere le malattie notificabili, se le condizioni di allevamento, come una biomassa media ed una discreta qualità dell'acqua, non siano tali da aumentare necessariamente il rischio di malattia e se gli animali siano destinati al consumo umano. Infine

un'azienda o zona destinata a molluschicoltura ha un rischio basso di contrarre e diffondere le malattie notificabili, se le condizioni di allevamento, come una scarsa biomassa ed una buona qualità dell'acqua, non siano tali da aumentare il rischio di malattia e se gli animali siano destinati esclusivamente al consumo umano.

**Tabella 5** Schema per la valutazione del rischio in aziende d'acquacoltura

PARAMETRI	DIREZIONE DEL RISCHIO	RISCHIO BASSO	RISCHIO ELEVATO
Acqua	Rischio di contrarre	Utilizzo dell'acqua da pozzo o sorgiva	Utilizzo dell'acqua di fiume, lago, mare
		Disinfezione dell'acqua in ingresso	
	Rischio di diffondere	Nessun rilascio di acqua a valle	Rilascio dell'acqua in fiume, lago, mare
		Disinfezione dell'acqua reflua	
Animali	Rischio di contrarre	Rilascio dell'acqua in bacini privi di specie sensibili	Introduzione di materiale di categoria III
		Introduzione di materiale da aziende di categoria I	
		Introduzione di uova disinfettate	
	Rischio di diffondere	Impiego di materiale di autoproduzione	Vendita di animali per il ripopolamento in aziende, laghetti di pesca sportiva ed in acqua libere
		Vendita di animali per il consumo umano	
		Vendita di uova disinfettate	
		Vendita di materiale di categoria I	

**Tabella 6** Schema per l'assegnazione del livello di rischio di contrarre le malattie notificabili attraverso l'acqua e gli animali d'acquacoltura

PROBABILITÀ DI CONTRARRE LA MALATTIA ATTRAVERSO L'ACQUA	PROBABILITÀ DI CONTRARRE LA MALATTIA ATTRAVERSO GLI ANIMALI	LIVELLO DI RISCHIO
Alta	Alta	Alto
Alta	Bassa	Medio
Bassa	Alta	Medio
Bassa	Bassa	Basso

**Tabella 7** Schema per l'assegnazione del livello di rischio di diffondere le malattie notificabili attraverso l'acqua e gli animali d'acquacoltura

PROBABILITÀ DI DIFFONDERE LA MALATTIA ATTRAVERSO L'ACQUA	PROBABILITÀ DI DIFFONDERE LA MALATTIA ATTRAVERSO GLI ANIMALI	LIVELLO DI RISCHIO
Alta	Alta	Alto
Alta	Bassa	Medio
Bassa	Alta	Medio
Bassa	Bassa	Basso

L'associazione tra il livello di rischio di contrarre (tabella 6) e diffondere (tabella 7) le malattie notificabili consente di assegnare all'impresa un livello di rischio complessivo (tabella 8)

**Tabella 8** Schema per l'assegnazione del livello rischio complessivo

RISCHIO DI CONTRARRE LA MALATTIA			
Alto	Medio	Alto	Alto
Medio	Basso	Medio	Alto
Basso	Basso	Basso	Medio
	Basso	Medio	Alto
	RISCHIO DI DIFFONDERE LA MALATTIA		

La sorveglianza sanitaria raccomandata nel corso delle ispezioni, secondo quanto riportato nell'allegato III, parte B del D.Lgs n. 148/2008 (tabella 9), può essere di tipo: passivo, attivo e mirato.

Nello specifico, la sorveglianza passiva prevede l'obbligo di immediata notifica dell'insorgenza o della sospetta presenza di una determinata malattia o di un aumento della mortalità, a cui deve seguire un'indagine epidemiologica ai sensi dell'articolo 29 dello stesso atto legislativo.

La sorveglianza attiva prevede:

- ispezioni regolari effettuate dall'autorità competente o da altri servizi sanitari per conto delle autorità competenti;
- esame della popolazione animale d'acquacoltura in azienda o nella zona destinata a molluschicoltura per accertare sintomi clinici della presenza della malattia;

- *prelievo di campioni ad uso diagnostico in caso di sospetta presenza di una delle malattie elencate o in caso di aumento accertato dei casi di mortalità durante l'ispezione;*
- *notifica immediata obbligatoria dell'insorgenza o della sospetta presenza di determinate malattie o di un aumento dei casi di mortalità.*

La sorveglianza mirata prevede:

- *ispezioni regolari effettuate dall'autorità competente o da altri servizi sanitari qualificati per conto delle autorità competenti;*
- *prelievo obbligatorio di campioni di animali d'acquacoltura da sottoporre a prove per accertare la presenza di agenti patogeni specifici tramite metodi prestabiliti;*
- *notifica immediata obbligatoria dell'insorgenza o della sospetta presenza di determinate malattie o di un aumento dei casi di mortalità.*

**Tabella 9** Sorveglianza ed ispezioni raccomandate in aziende e zone destinata a molluschicoltura (allegato III, parte B del D.Lgs n. 148/2008)

SPECIE PRESENTI	CATEGORIA	LIVELLO DI RISCHIO	SORVEGLIANZA	FREQUENZA DELLE ISPEZIONI RACCOMANDATA DALL'AUTORITÀ COMPETENTE (ART. 8)	FREQUENZA DELLE ISPEZIONI RACCOMANDATA DAI SERVIZI SANITARI QUALIFICATI PER GLI ANIMALI ACQUATICI (ART.11)
Specie non sensibili	I	Basso	Passiva	1 ogni 4 anni	1 ogni 4 anni
		Elevato		1 all'anno	1 all'anno
		Medio		1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni
	II	Basso	Attiva, mirata o passiva	1 ogni 4 anni	1 ogni 2 anni
		Elevato		1 all'anno	1 all'anno
		Medio		1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni
	III	Basso	Mirata	1 ogni 4 anni	1 ogni 2 anni
		Elevato		1 all'anno	3 all'anno
		Medio		1 all'anno	2 all'anno
Specie sensibili	IV	Basso	Attiva	1 ogni 2 anni	1 all'anno
		Elevato		1 ogni 2 anni	1 all'anno
		Medio		1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni
	V	Basso	Mirata	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni
		Elevato		1 ogni 4 anni	1 all'anno
		Medio		1 ogni 4 anni	1 ogni 2 anni
		Basso	Passiva	1 ogni 4 anni	1 ogni 2 anni
		Elevato		1 ogni 4 anni	1 ogni 2 anni
		Medio		1 ogni 4 anni	1 ogni 2 anni

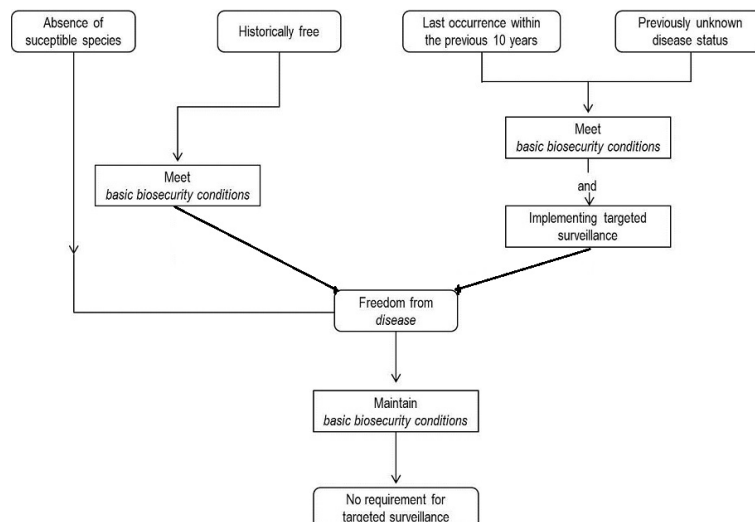
Un territorio nazionale, una zona o compartimento, sono dichiarati indenni da una o più malattie notificabili non esotiche, qualora siano rispettati i seguenti requisiti, indicati negli articoli 46 e 47 dello stesso atto legislativo:

- nessuna delle specie sensibili alla malattia o alle malattie in questione sia presente;
- sia noto che l'agente eziologico della malattia o delle malattie in questione non sia in grado di sopravvivere nelle sue acque;
- siano rispettate le condizioni enunciate all'allegato V del D.Lgs n. 148/2008.

Secondo quanto riportato nell'allegato V del D.Lgs n. 148/2008, uno Stato membro, una zona o compartimento in cui siano presenti specie sensibili e condizioni favorevoli alla manifestazione clinica delle malattie notificabili ed in cui non siano state registrate manifestazioni patologiche nell'arco dei 10 anni precedenti la data di applicazione dello status di indenne da malattia, sono dichiarati indenni alle seguenti condizioni:

- *almeno nei 10 anni precedenti la data di applicazione dello status di indenne da malattia ha rispettato senza interruzione le condizioni di base in materia di biosicurezza;*
- *l'infezione non è notoriamente presente nelle popolazioni di specie selvatiche;*
- *applica a scambi e importazioni misure efficaci atte a prevenire la diffusione della malattia al suo interno.*

**Figura 5** Procedure per dichiarare l'indennità dalle malattie notificabili (Codice di Sanità per gli Animali Acquatici OIE, 2015)



Uno Stato, membro, una zona o compartimento in cui sia stata registrata la presenza di una o più malattie notificabili nell'arco dei 10 anni precedenti la data di applicazione dello status di indenne da malattia, ed in cui non siano disponibili dati sulla malattia prima dell'applicazione della sorveglianza mirata, possono essere considerati indenni se rispettano le condizioni di base in materia di biosicurezza e se *la sorveglianza mirata è in atto da almeno due anni senza che sia stata individuata la presenza dell'agente patogeno nell'azienda o nella zona destinata a molluschicoltura che alleva specie sensibili*.

Inoltre, in un territorio non dichiarato indenne da una o più malattie notificabili non esotiche, il mantenimento del riconoscimento di indennità di una zona o compartimento è ottenuto, ai sensi dell'articolo 49 dello stesso atto legislativo, mediante l'esecuzione di una sorveglianza mirata. Tuttavia, la sospensione del riconoscimento di indennità di un territorio, di una zona o compartimento può verificarsi, ai sensi dell'articolo 50, qualora l'indagine epidemiologica descritta nell'articolo 29, riveli la presenza di una o più malattie notificabili. I requisiti necessari per il ripristino dello status di indenne da malattia sono riportati nell'allegato V del suddetto atto legislativo.

### 4.3 Misure minime di lotta contro le malattie notificabili

In ottemperanza al capo V del D.Lgs n. 148/2008, l'aumento del tasso di mortalità degli animali d'acquacoltura deve essere denunciato al servizio veterinario dell'Azienda sanitaria locale competente per territorio che, a sua volta, deve denunciare la sospetta presenza di una delle malattie notificabili al Ministero del lavoro, della salute delle politiche sociali ed alla regione ed effettuare un campionamento di animali destinato ad esami diagnostici eseguiti presso gli istituti zooprofilattici sperimentali.

In attesa dei risultati degli esami diagnostici, devono essere applicate misure di lotta idonee a prevenire la diffusione della malattia, devono essere vietate le movimentazioni di animali in entrata ed uscita dall'azienda o dalla zona destinata a molluschicoltura senza autorizzazione del servizio veterinario dell'Azienda sanitaria locale competente per territorio e deve essere avviata un'indagine epidemiologica volta a:

- determinare le possibili origini e vie di diffusione della malattia;*
- accertare se animali di acquacoltura abbiano lasciato l'azienda, la zona o la zona destinata a molluschicoltura nel periodo precedente alla notifica del caso sospetto soggetto a denuncia;*
- indagare se sono state infettate altre aziende, zone o zone destinate a molluschicoltura.*

Nel caso in cui sia confermata la presenza di una delle malattie notificabili, il servizio veterinario dell'Azienda sanitaria locale competente per territorio, ai sensi degli articoli 31 e 36 del D.Lgs n. 148/2008, deve dichiarare l'azienda o la zona destinata a molluschicoltura interessata ufficialmente infetta e deve creare intorno ad essa una zona di protezione, verificando che non siano realizzate movimentazioni di animali senza autorizzazione.

Al raggiungimento della taglia commerciale ed in assenza di manifestazioni cliniche di malattia, gli animali d'acquacoltura, secondo l'articolo 32 del D.Lgs n. 148/2008, sono raccolti e destinati al consumo umano e, con il controllo dell'Autorità sanitaria locale competente per territorio, inviati successivamente a centri di spedizione, di depurazione e di lavorazione dotati di un sistema di trattamento delle acque reflue che garantisca l'inattivazione degli agenti patogeni o la riduzione ad un livello accettabile del rischio di trasmissione delle malattie nel sistema idrico naturale. Gli articoli 34 e 35 del D.Lgs n. 148/2008, stabiliscono che qualora sia possibile, un'azienda o una zona destinata a molluschicoltura dichiarate ufficialmente infette da una o più malattie notificabili, devono essere svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte ad un periodo di fermo dell'impianto, fino a quando:

- non siano state applicate le misure minime di lotta;

- gli esami diagnostici di campioni prelevati nella zona di protezione, non abbiano fornito un risultato negativo per la presenza dell'agente patogeno.

Nel caso in cui sia sospettata e vi sia la presenza di segni clinici di una delle malattie notificabili, sono realizzate, ai sensi dell'articolo 38 del D.Lgs n. 148/2008, attività di monitoraggio ed applicate misure per evitare la diffusione della malattia ad opera del Ministero del lavoro, della salute delle politiche sociali, tramite il Centro nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie degli animali e d'intesa con il Centro nazionale di riferimento per l'ittiopatologia.

#### 4.4 Laboratori di riferimento

In accordo agli articoli 52 e 53 del D.Lgs n. 148/2008, il Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali nomina, per ciascun laboratorio comunitario di riferimento, un laboratorio nazionale di riferimento. In Italia, tale laboratorio corrisponde al Centro di riferimento nazionale (C.R.N.) per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie che a sua volta, collabora con i laboratori designati negli Stati membri, corrispondenti, in Italia, agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (I.I.Z.S.), garanti del servizio diagnostico relativamente alle malattie notificabili sull'intero territorio nazionale.

La conferma diagnostica di un risultato positivo per uno o più agenti eziologici delle malattie notificabili è eseguita presso il C.R.N. per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei. Secondo quanto indicato nell'allegato VI, parti I, II e III del D.Lgs n. 148/2008, i laboratori comunitari, nazionali di riferimento ed i laboratori designati dagli Stati membri devono operare, essere valutati ed accreditati, o avere singole prove o gruppi di prove accreditate e valutate, secondo le seguenti norme europee:

- EN ISO/IEC 17025 «Criteri generali sulla competenza dei laboratori di prova e di taratura»;*
- EN 45002 «Criteri generali per la valutazione dei laboratori di prova»;*
- EN 45003 «Sistema di accreditamento del laboratorio di collaudo e taratura – criteri generali di funzionamento e riconoscimento».*

I laboratori nazionali di riferimento ed i laboratori designati dagli Stati membri qualora non possano soddisfare nella pratica i requisiti dettati dalla norma EN ISO/IEC 17025, devono tuttavia operare in base ad un sistema di garanzia della qualità conforme alla norma ISO 9001.

Nello specifico, i laboratori comunitari di riferimento: garantiscono la fornitura di materiale diagnostico di riferimento, organizzano periodicamente prove comparative delle procedure diagnostiche destinate ai laboratori nazionali di riferimento, offrono conferma diagnostica, provvedono alla formazione ed all'aggiornamento professionale, collaborano con i laboratori competenti dei Paesi terzi e con i laboratori di riferimento dell'OIE e forniscono dati relativi alle malattie emergenti.

I laboratori nazionali di riferimento: segnalano, all'autorità competente, il sospetto di una delle malattie notificabili, coordinano, con il laboratorio comunitario di riferimento, i metodi per la diagnosi delle suddette malattie, utilizzati nei rispettivi Stati membri ed in particolare, provvedono ad armonizzare le tecniche diagnostiche mediante la formazione, l'aggiornamento professionale, l'organizzazione periodica di prove comparative delle procedure diagnostiche con i laboratori designati negli Stati membri e la partecipazione a prove comparative organizzate dai laboratori comunitari di riferimento.

Infine, i laboratori designati negli Stati membri oltre a segnalare, all'autorità competente, il sospetto di una delle malattie notificabili, devono partecipare alle prove comparative organizzate dal laboratorio nazionale di riferimento.

#### 4.5 Future prescrizioni: Decisione di esecuzione 2015/1554/UE

L'ultimo atto legislativo riguardante gli aspetti sanitari degli animali acquatici, in applicazione a decorrere dal 1 aprile 2016, è la Decisione di esecuzione della commissione (UE) 2015/1554 dell'11 Settembre 2015 recante modalità di applicazione della direttiva 2006/88/CE per quanto riguarda le prescrizioni in materia di sorveglianza e di metodi diagnostici. La parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, relativa alle prescrizioni specifiche per *M. refringens*, conferma quasi totalmente quanto riportato nel Manuale per la Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015), tuttavia, prescrive misure dettagliate relativamente al periodo ed alle modalità di campionamento nonché alle modalità di conservazione di campioni ufficiali ed in autocontrollo.

Secondo la parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario indeterminato (categoria III) può ottenere lo stato sanitario indenne (categoria I), relativamente all'infezione di *M. refringens*, quando tutte le zone destinate alla molluschicoltura con specie sensibili, siano sottoposte ad un programma di sorveglianza biennale che preveda, le seguenti prescrizioni:

- ispezioni sanitarie seguite da un prelievo di 150 molluschi con frequenza annuale da sottoporre ad esami diagnostici secondo metodiche descritte dallo stesso atto legislativo;
- ottenimento di risultati negativi a tutti gli esami diagnostici eseguiti volti alla ricerca di *M. refringens* ed esclusione di qualsiasi sospetto d'infezione;
- introduzione delle specie sensibili, provenienti da uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimenti con stato sanitario indenne (categoria I), almeno nella primavera che precede il periodo nel quale è eseguito il programma di sorveglianza.

Secondo la parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario infetto (categoria V) può ottenere lo stato sanitario indenne (categoria I) relativamente all'infezione da



*M. refringens*, quando tutte le zone destinate alla molluschicoltura con specie sensibili, siano sottoposte ad un programma di eradicazione secondo quanto riportato al capo V, sezione 3, della direttiva 2006/88/CE. A tal proposito, lo stesso atto legislativo, stabilisce che debbano essere predisposte una zona riservata alla protezione, immediatamente adiacente alla zona destinata alla molluschicoltura dichiarata infetta da *M. refringens*, ed una zona per la sorveglianza, circondante la zona di protezione. La definizione della zona di protezione deve essere eseguita in considerazione dei fattori influenzanti il rischio di diffusione della *Marteiliosi* e specifici per ciascuna zona destinata alla molluschicoltura quali:

- l'età degli molluschi allevati;
- il tasso e la distribuzione della mortalità sia di molluschi allevati che selvatici;
- la distanza e la densità delle zone destinate alla molluschicoltura limitrofe;
- la presenza di specie sensibili e vettrici;
- le pratiche di allevamento;
- le condizioni idrodinamiche;
- altri eventuali fattori di rilevanza epidemiologica.

Le prescrizioni in materia di eradicazione prevedono l'esecuzione, nelle zone di protezione, di almeno un campionamento ufficiale di 150 molluschi dopo l'inizio del periodo di trasmissione di *M. refringens* ed in assenza di tali informazioni, nel periodo successivo al superamento della temperatura dell'acqua di 17°C (Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, parte 4). Lo stesso atto legislativo specifica la durata del periodo di fermo degli impianti dichiarati ufficialmente infetti ma sottoposti ad un programma di eradicazione (categoria IV) che deve essere di almeno 4 settimane, e di durata variabile, da 2 a 14 mesi, a seconda dei collegamenti con le acque circostanti e del periodo dell'anno in cui è stata realizzata la rimozione degli individui infetti.

Al fine di mantenere l'indennità (categoria I), le zone destinate alla molluschicoltura con specie sensibili devono essere sottoposte ad una sorveglianza mirata (tabella 10) con una frequenza delle ispezioni basata sulla valutazione del rischio (tabelle 5-8) di contrarre e diffondere la *Marteiliosi*. Tutti i campioni esaminati devono risultare negativi per la presenza di *M. refringens* e qualsiasi sospetto d'infezione deve essere escluso attraverso l'applicazione di metodi diagnostici descritti dallo stesso atto legislativo.

**Tabella 10** Programmi di sorveglianza sanitaria al fine di mantenere lo status di indenne da *M. refringens* (Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, parte 4)

LIVELLO DI RISCHIO	FREQUENZA ISPEZIONI SANITARIE	FREQUENZA ESAMI DI LABORATORIO	NUMEROSITÀ CAMPIONARIA
Elevato	1 all'anno	1 ogni 2 anni	150
Medio	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni	150
Basso	1 ogni 2 anni	1 ogni 4 anni	150

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario infetto (categoria V), relativamente all'infezione di *M. refringens*, può ottenere lo stato sanitario indeterminato (categoria III), qualora siano rispettate le seguenti prescrizioni in materia di eradicazione:

- esecuzione del ripopolamento con molluschi provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con stato sanitario di categoria I, II o III;
- esecuzione del ripopolamento esclusivamente dopo lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione ed il periodo di fermo;
- esclusione di qualsiasi sospetto d'infezione nei due anni successivi all'applicazione delle misure di eradicazione.

La parte 4 della Decisione di esecuzione (UE) 2015/1554, specifica che qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate possono essere sottoposte ad una misura alternativa tale da fornire garanzie simili all'eliminazione del parassita dall'ambiente dell'azienda.

#### 4.6 Prescrizioni specifiche per il campionamento

Secondo quanto riportato nel Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015) e nella Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, parte 4, il campionamento delle specie sensibili a *M. refringens* deve essere eseguito nel periodo in cui la prevalenza del parassita sia notoriamente massima, tuttavia, nel caso in cui risultino assenti tali informazioni, la parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, specifica che il campionamento debba essere eseguito quando la temperatura dell'acqua supera i 17°C. Al fine di aumentare la probabilità di prelevare animali infetti, lo stesso atto legislativo, coerentemente a quanto indicato nel Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015), stabilisce che debbano essere prelevati prioritariamente i molluschi bivalvi deboli, dalle valve beanti o morti da poco tempo ma non decomposti. Tuttavia, in assenza di individui con tali caratteristiche, devono essere selezionati i molluschi bivalvi sani di età più avanzata. La parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, inoltre, specifica che in presenza nella stessa area produttiva, di specie appartenenti ai generi *Ostrea* spp. e *Mytilus* spp., il campionamento deve comprendere, in egual misura, le specie presenti. Il campionamento deve essere realizzato da un numero sufficiente di punti di prelievo, la cui scelta deve essere valutata in considerazione dei seguenti fattori:

- gli eventuali dati pregressi sulla presenza di *M. refringens*;
- la densità di allevamento;
- l'idrodinamismo;
- la presenza di specie sensibili e vettrici;

- le caratteristiche batimetriche;
- le pratiche di gestione.

Secondo quanto riportato nel Codice di Sanità per gli Animali Acquatici OIE (2015), in una popolazione infinita che supera la decina di migliaia di soggetti, come in un allevamento di molluschi bivalvi, il campionamento deve essere costituito da almeno 149 soggetti, per poter rilevare almeno un soggetto positivo ad una patologia con una prevalenza di almeno il 2% ed una confidenza del 95%. Secondo la parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, i campionamenti ufficiali devono prevedere il prelievo di 30 individui delle specie sensibili, se il sospetto deriva da un evento di mortalità, o di 150 individui dopo l'inizio del periodo di trasmissione della *Marteiliosi* o quando la temperatura dell'acqua supera i 17°C.

#### 4.7 Diagnosi delle malattie notificabili

I metodi per la diagnosi delle malattie notificabili sono descritti nel Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE, sottoposto a continui aggiornamenti. Il Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015), coerentemente a quanto riportato nell'allegato IV del D.Lgs n. 148/2008, e nella parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, riporta che ogni laboratorio deve operare secondo criteri di qualità internazionali.

I metodi diagnostici raccomandati per la sorveglianza mirata, la diagnosi presuntiva e la diagnosi di conferma della *M. refringens* sono riportati nella tabella 11. In particolare, la sorveglianza mirata consiste nel controllo di routine di prima istanza della presenza del parassita, mentre la diagnosi presuntiva è impiegata in aree dove sia stata già confermata la presenza della malattia ed infine la diagnosi di conferma prevede l'identificazione certa del patogeno (De Vico & Carrella, 2012). La lettera "a" indica un metodo raccomandato per facilità applicativa, utilità, sensibilità e specificità diagnostica; la lettera "b" indica un metodo da considerarsi standard e con buona sensibilità e specificità; la lettera "c" indica un metodo applicabile solo in alcuni casi, tuttavia gli elevati costi, la ridotta accuratezza ed altri fattori limitano la sua applicazione; infine la lettera "d" indica un metodo efficace ma non ideale per la specifica applicazione (tabella 11).

**Tabella 11** Metodi raccomandati per la diagnosi di *M. refringens* (Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE, 2015)

METODICA	SORVEGLIANZA MIRATA				DIAGNOSI PRESUNTIVA	DIAGNOSI DI CONFERMA
	LARVE	POST-LARVE	GIOVANILI	ADULTI		
Alterazioni macroscopiche	d	d	c	c	c	d
Preparato a fresco	d	d	c	c	c	d
Citologia per apposizione	d	d	b	b	a	c
Istopatologia	d	d	a	a	b	c
Ibridizzazione <i>in situ</i> (ISH)	d	d	d	d	d	b
Reazione a catena della polimerasi (PCR)	a	a	a	a	a	a
Sequenziamento	d	d	d	d	d	a
Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	d	d	d	d	d	b

Gli esami citologico ed istologico sono raccomandati sia per le attività diagnostiche di routine che la diagnosi presuntiva della presenza di *Marteilia* spp. (tabella 11) ma non consentono l'identificazione certa del patogeno a livello di specie e non sono conseguentemente raccomandati per la diagnosi di conferma di *M. refringens* (tabella 11). Pertanto, nel caso in cui l'area del campionamento non sia categorizzata dal punto di vista sanitario, il Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015), raccomanda, congiuntamente agli esami citologico ed istologico, l'utilizzo di metodiche molecolari. Diversamente, gli esami citologico ed istologico sono ritenuti validi per la diagnosi dell'infezione in campioni prelevati da aree classificate come infette (categoria V) ed in cui sia stata già confermata la presenza di *M. refringens* (Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE, 2015). L'analisi in PCR garantisce l'identificazione del patogeno e la conferma dell'infezione, pertanto, è raccomandata per attività di monitoraggio di routine, diagnosi presuntiva e di conferma (tabella 11).

**Tabella 12** Metodi diagnostici prescritti per la diagnosi di *M. refringens* (Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, parte 4)

METODO	SORVEGLIANZA MIRATA	DIAGNOSI PRESUNTIVA	DIAGNOSI DI CONFERMA
Citologia per apposizione	X	X	X, oppure
Istopatologia	X		X, oppure
Ibridizzazione <i>in situ</i> (ISH)			X, e
Reazione a catena della polimerasi (PCR)	X	X	X, e
Sequenziamento			X

Coerentemente a quanto raccomandato nel Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015), la parte 4 della Decisione di esecuzione 2015/1554/UE stabilisce che i metodi diagnostici per l'ottenimento ed il mantenimento dello status

d'indennità (categoria I) relativamente all'infezione di *M. refringens* sono: la citologia per apposizione, l'istologia o la PCR, mentre la conferma della presenza di *M. refringens* è ottenuta quando la positività registrata mediante gli esami istologico, citologico o ISH sia accompagnata da un risultato positivo mediante PCR completata dal sequenziamento (tabella 12).

## CAPITOLO V

### Applicazione delle prescrizioni e dati epidemiologici

#### 5.1 Limiti nel settore della molluschicoltura

Le prescrizioni relative ai programmi di sorveglianza sanitaria e di eradicazione, legiferate nel D.Lgs n. 148/2008, risultano più facilmente applicabili agli allevamenti ittici, rispetto al settore della molluschicoltura, in quanto caratterizzati da ambienti confinati con punti di carico e scarico delle acque identificati, nonché dall'accrescimento di avannotti riprodotti artificialmente. Al contrario, gli impianti di molluschicoltura sono caratterizzati dall'assenza di delimitazioni e da pratiche zootecniche, come la cattura di seme selvatico ed il successivo accrescimento in resta, che rendono l'applicazione delle suddette prescrizioni particolarmente limitata (De Vico & Carrella, 2012).

L'assenza di ambienti confinati, rappresenta il principale problema ai fini della valutazione del rischio di contrarre e diffondere le malattie notificabili dei molluschi bivalvi, realizzata come indicato nelle tabelle 5-8.

Nello specifico, ai sensi dell'articolo 16 del D.Lgs. n. 148/2008, la movimentazione di specie ittiche, sensibili alle malattie notificabili: necrosi ematopoietica infettiva (NEI) e setticemia emorragica vitale (SEV), a scopo di ripopolamento o in laghetti di pesca sportiva, è consentita solo se l'azienda di provenienza sia stata dichiarata indenne da tali malattie (tabella 4). Diversamente, per la movimentazione dei molluschi bivalvi a scopo di allevamento, è sufficiente che questi siano clinicamente sani e non sia stata registrata alcuna mortalità anomala nell'area di provenienza (art. 16 del D.Lgs. n. 148/2008). Tale considerazione, unitamente alla difficile applicazione delle prescrizioni sanitarie in materia di eradicazione, ai sensi del D.Lgs n. 148/2008, ed all'assenza di gravi mortalità registrate nel settore della mitilicoltura, motiva in U.E., la quasi totale assenza di richieste di riconoscimento dell'indennità delle zone destinate alla mitilicoltura e, nello specifico, in Italia, il ridotto numero di regioni che, attualmente e negli anni passati, ha attuato costantemente piani di monitoraggio sulla molluschicoltura, relativamente alla presenza di *M. refringens*, in ottemperanza al D.Lgs n. 148/2008 (figura 10).

D'altro canto, la disponibilità di dati epidemiologici relativamente agli eventi di mortalità dei molluschi bivalvi, risulta necessaria al fine di ottemperare alle prescrizioni normate per l'esportazione nei Paesi membri (Pellumb et al., 2006), in considerazione dell'importanza che la molluschicoltura riveste in molti paesi dell'U.E. dal punto di vista socio-economico (figura 7).

#### 5.2 Molluschicoltura: dati produttivi europei ed italiani

Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), la molluschicoltura rappresenta un'importante voce produttiva per l'acquacoltura dell'U.E., in particolare, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* e *C. gigas* sono considerate tra le specie che maggiormente incidono sulle produzioni acquacolturali comunitarie (FAO, 2014) (tabella 13)

**Tabella 13** Produzioni acquacolturali nell'U.E. per l'anno 2012 (FAO, 2014)

SPECIE	NOME SCIENTIFICO	TONNELLATE
Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	176.707
Salmone atlantico	<i>Salmo salar</i>	175.349
Cozza atlantica	<i>Mytilus edulis</i>	150.966
Ostrica concava	<i>Crassostrea gigas</i>	91.238
Cozza o mitilo	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	111.590
Orata	<i>Sparus aurata</i>	102.232
Spigola	<i>Dicentrarchus labrax</i>	68.564
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	65.009
Vongola verace	<i>Ruditapes philippinarum</i>	31.836
Rombo chiodato	<i>Psetta maxima</i>	12.647
Anguilla	<i>Anguilla anguilla</i>	4.692
Pesce gatto africano	<i>Clarias gariepinus</i>	3.792
Vongola verace	<i>Ruditapes decussatus</i>	4.104
Trota di mare	<i>Salmo trutta</i>	3.354
Ostriche	<i>Crassostrea spp.</i>	2.337
Carpa argentata	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	3.877
Carpa testa grossa	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	2.472
Ostrica piatta	<i>Ostrea edulis</i>	2.184
Triotto rosso	<i>Rutilus rutilus</i>	1.900
Storioni	<i>Acipenseridae</i>	1.884
Altre specie	-	236.903

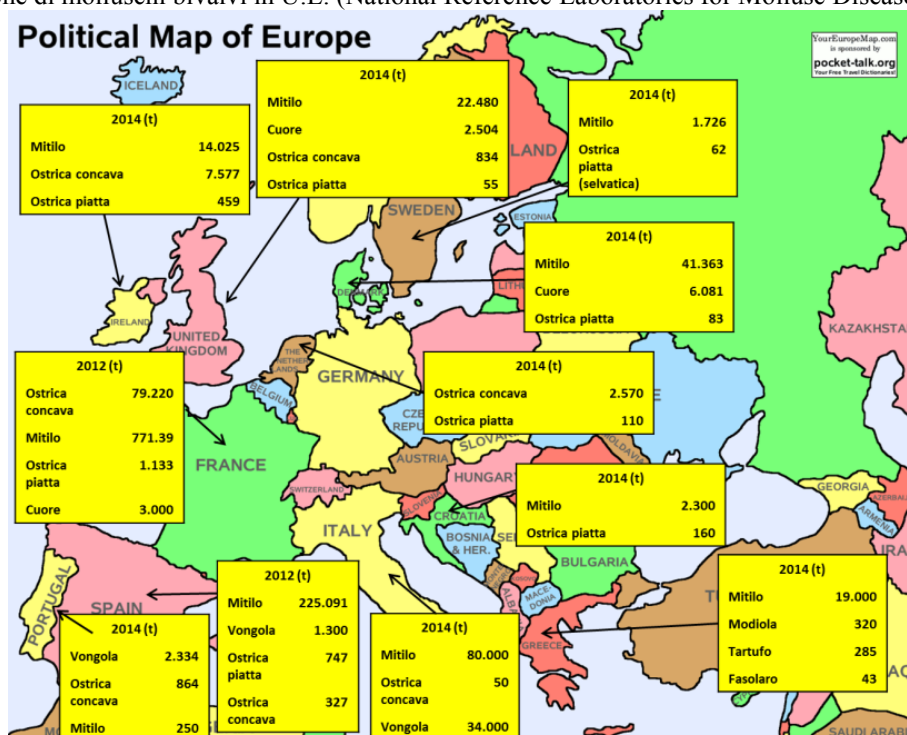
I principali Paesi produttori di molluschi sono: la Spagna, la Francia e l'Italia (FAO, 2014) (figura 6).

La molluschicoltura italiana si basa principalmente sull'allevamento di *M. galloprovincialis* e *T. philippinarum* ed in misura inferiore di *T. decussatus*, *C. gigas* e *O. edulis* (Prioli, 2008). L'Italia è il principale produttore dell'U.E. di *T. philippinarum* con un volume pari a 94,2% e copre, con la produzione di *M. galloprovincialis* ed un volume pari a 70,8%, i due terzi della produzione acquacolturale comunitaria (tabella 14) (FAO, 2014).

**Tabella 14** Incidenza delle specie allevate in Italia sulla produzione acquacolturale dell'U.E. per l'anno 2012 (FAO, 2014)

SPECIE	NOME SCIENTIFICO	PESO %
Cozza o mitilo	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	70,8
Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	19,5
Vongola verace	<i>Ruditapes philippinarum</i>	94,2
Spigola	<i>Dicentrarchus labrax</i>	9,8
Orata	<i>Sparus aurata</i>	5,3
Trota di mare	<i>Salmo trutta</i>	44,7
Storioni	<i>Acipenseridae</i>	45,0
Vongola verace	<i>Ruditapes decussatus</i>	39,0
Anguilla	<i>Anguilla anguilla</i>	10,7
Cefalo	<i>Mugil cephalus</i>	49,4
Altre specie	-	0,3

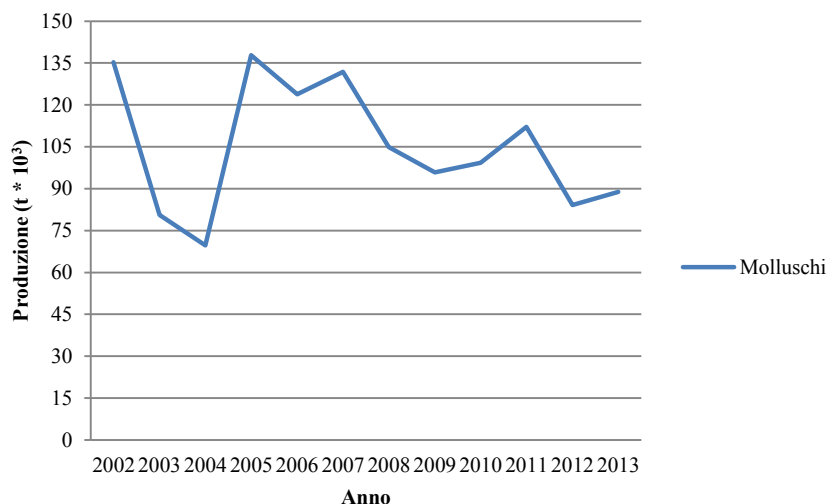
Secondo dati recenti forniti dal Centro di riferimento nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei, le produzioni italiane, registrate per l'anno 2014, sono pari a: 80.000 t per la specie *M. galloprovincialis*, 34.000 t per la specie *T. philippinarum* e 50 t per la specie *C. gigas*. Come si evince dalla figura 6, l'Italia è al terzo posto preceduto dalla Spagna e dalla Francia, relativamente alla produzione di *M. galloprovincialis*, mentre è al primo posto per quanto riguarda la produzione di *T. philippinarum* seguita dal Portogallo e della Spagna.

**Figura 6** Produzione di molluschi bivalvi in U.E. (National Reference Laboratories for Mollusc Diseases, 2015)

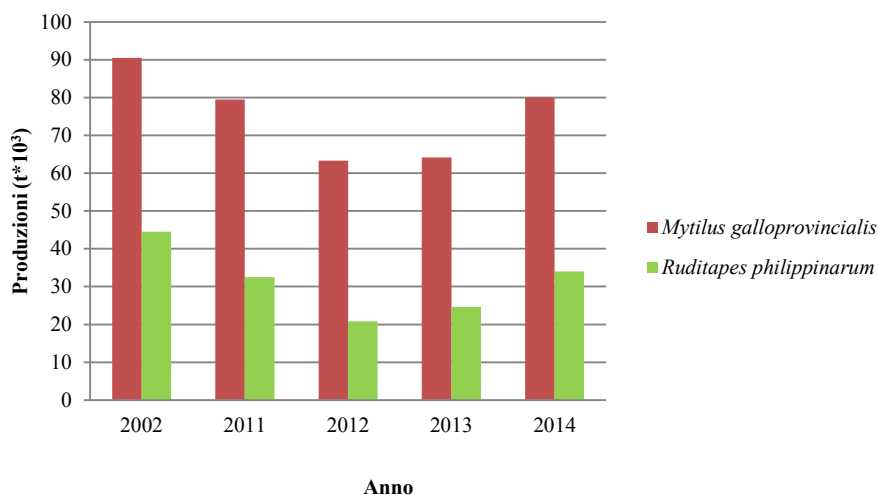
Fonti statistiche nazionali, riportano che gli andamenti produttivi della molluschicoltura italiana, per il periodo compreso dal 2002 al 2013, hanno mostrato significative oscillazioni nel corso degli anni (figura 7). In particolare, le produzioni di molluschi, nel 2003 e nel 2004, hanno mostrato una netta riduzione come conseguenza del raggiungimento di temperature estive molto elevate, mentre, dal 2005 al 2007 è stato osservato un nuovo incremento delle produzioni. I dati registrati dal 2009 al 2012, mostrato una riduzione delle produzioni di molluschi di oltre il 20% (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali Mi.P.A.A.F.-Unimar, 2014) seguita da una lieve ripresa pari al 5,7% registrata per l'anno 2013 (figura 7).

Gli andamenti delle produzioni italiane delle specie *T. philippinarum* e *M. galloprovincialis*, riflettono l'andamento produttivo complessivo relativamente alla molluschicoltura (figura 7), mostrando per entrambe le specie una riduzione graduale delle produzioni, con valori, registrati nel 2012, pari a 20,8 e 63,3 t x 10<sup>3</sup> rispettivamente per *T. philippinarum* e *M. galloprovincialis*, seguita da una lieve ripresa nel 2013 e, secondo quanto riportato in figura 6, un'importante ripresa nel 2014 (figura 8).

**Figura 7** Andamento produttivo della molluschicoltura in Italia (Mi.P.A.A.F.-Unimar, 2014)



**Figura 8** Andamenti produttivi della mitilicoltura e venericoltura in Italia (Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale ISPRA; Mi.P.A.A.F.-Unimar, 2014; National Reference Laboratories for Mollusc Diseases, 2015)



Le principali aree produttive per l'allevamento e la raccolta dei molluschi bivalvi sono localizzate nelle seguenti Regioni: Puglia, Liguria, Veneto, Campania, Friuli-Venezia Giulia, Sardegna, Emilia-Romagna, Marche, Abruzzo. Nell'anno 2013, l'Emilia Romagna, con il 45,7%, ed il Veneto, con il 20,6%, rappresentano le principali Regioni italiane produttrici di mitili e vongole e contribuiscono al 66% della molluschicoltura nazionale, seguite successivamente dalla Puglia (13,1%), il Friuli Venezia Giulia (4,95%), la Sardegna (3,4%), le Marche (3,3%) e la Campania (3,2%) (ISPRA; Mi.P.A.A.F.-Unimar, 2014). La venericoltura è praticata soprattutto in Veneto ed in Emilia Romagna negli ambienti lagunari ed estuarini mentre la produzione di mitili caratterizza maggiormente le Regioni adriatiche e tirreniche.

La mitilicoltura rappresenta in Italia, la principale attività di allevamento (figura 6) relativamente agli animali acquatici sia per i quantitativi di prodotto allevato che per la diffusione ed il numero di impianti produttivi sul territorio nazionale (tabella 15). Pertanto, tale attività produttiva è diffusa lungo la maggior parte delle coste italiane ed in circa il 50% degli impianti produttivi attivi sono allevati mitili (Prioli, 2008).

Malgrado la mitilicoltura rappresenti la principale voce produttiva per l'acquacoltura nazionale (figura 6), l'Italia è tra i maggiori paesi importatori di mitili, secondo solo alla Francia, per quantità di prodotto importato, provenienti principalmente dalla Spagna e dalla Grecia (Prioli, 2008). La maggior quantità di prodotto importato è stata registrata in autunno ed in inverno, quando generalmente si verifica la riduzione della produzione nazionale a causa del ciclo riproduttivo e della conseguente ridotta resa in carne. Coerentemente a quanto riportato, anche l'esportazione di mitili segue in andamento annuale, con valori massimi registrati durante i periodi primaverile ed estivo, e con valori minimi nel corso del periodo invernale (Prioli, 2008).



**Tabella 15** Numero di impianti attivi di mitilicoltura nelle Regioni italiane per il 2014 (Mi.P.A.A.F.-Unimar, 2014)

REGIONE	N. IMPIANTI ATTIVI ALLEVAMENTO MITILI
Abruzzo	5
Campania	31
Emilia Romagna	29
Friuli Venezia Giulia	59
Lazio	13
Liguria	3
Marche	16
Molise	2
Puglia	50
Sardegna	42
Sicilia	4
Veneto	50

### 5.3 Quadro epidemiologico dell'U.E.

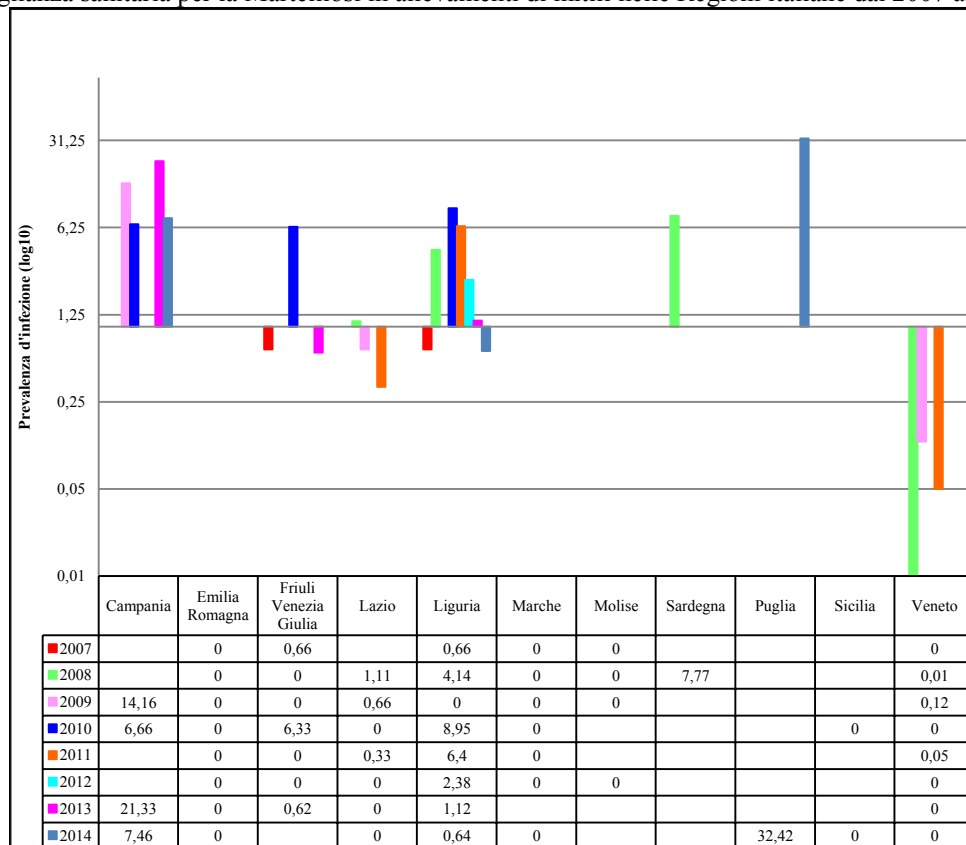
Attualmente, secondo dati forniti dal C.R.N. per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei, le malattie notificabili non esotiche, sostenute da *B. otreae* e *M. refringens*, sono endemiche in tutti i Paesi dell'U.E. ed esclusivamente in Gran Bretagna ed in Danimarca, esistono aree indenni da tali patogeni e pertanto sottoposte ad una stretta sorveglianza sanitaria.

Altri Paesi membri come la Spagna e la Francia hanno sospeso le attività di monitoraggio relativamente alle malattie notificabili non esotiche e pertanto, hanno convertito il proprio stato sanitario da infetto (categoria V) ad indeterminato (categoria III). Ad oggi, l'Italia a differenza della Spagna e della Francia, prosegue le attività di monitoraggio in ottemperanza al D.Lgs n. 148/2008 ed ai Piani Regionali di monitoraggio mantenendo pertanto, uno stato sanitario infetto (categoria V).

I dati relativi alla sorveglianza sanitaria condotta in Italia, dall'anno 2007 all'anno 2014 (figura 9), e raccolti dal C.R.N. per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei, consentono di evidenziare che, delle 11 Regioni italiane dove la mitilicoltura è diffusa, soltanto 6 ed in particolare: l'Emilia Romagna, il Friuli Venezia Giulia, il Lazio, la Liguria, le Marche ed il Veneto, hanno realizzato costantemente le attività di monitoraggio per la ricerca di *M. refringens*. Le prevalenze d'infezione risultano costantemente basse nelle Regioni adriatiche, con valore minimo registrato in Veneto nel 2008, pari a 0,01%. In molte Regioni è stata registrata l'assenza del parassita, in particolare, gli esiti della sorveglianza sanitaria in Emilia Romagna e nelle Marche, permettono di evidenziare la costante assenza di *M. refringens* dal 2007 al 2014. Al contrario in Puglia, sebbene non siano note attività di monitoraggio fino al 2013, la prevalenza d'infezione registrata nel 2014, pari a 32,42%, è la più elevata nel periodo di tempo considerato. I dati di prevalenza dell'infezione registrati nelle Regioni tirreniche, come la Liguria e la Campania, si attestano su valori medio-bassi con un valore massimo, pari a 23,33%, registrato in Campania nel 2013. Malgrado le prevalenze d'infezione registrate nelle Regioni tirreniche siano molto variabili, a causa della diversa numerosità campionaria, tuttavia, *Marteilia* spp. risulta costantemente presente ad eccezione del monitoraggio eseguito in Liguria nel 2009 (figura 9).

I dati relativi alle attività di monitoraggio sanitario per la ricerca di *M. refringens* condotte in allevamenti di *C. gigas* nelle Regioni: Emilia Romagna, Lazio, Veneto, Marche e Sicilia tra gli anni 2010 e 2013, nonché in banchi naturali di *M. galloprovincialis* e *C. gigas* in Sicilia nell'anno 2012, rivelano costantemente l'assenza del parassita. Dal 2007 al 2014 non sono stati registrati eventi di mortalità anomala in allevamenti di *M. galloprovincialis* e *C. gigas*.

**Figura 9** Sorveglianza sanitaria per la Marteiliosi in allevamenti di mitili nelle Regioni italiane dal 2007 al 2014



#### 5.4 Sistemi di allevamento e gestione igienico-sanitaria

La mitilicoltura è praticata mediante tre sistemi di allevamento principali: a pali fissi, a filari galleggianti o long-line monoventia ed a filari galleggianti o long-line a più ventie. Il sistema fisso, tipicamente adottato in aree lagunari, costiere e riparate, prevede la disposizione di pali in cemento o in metallo, collegati tra loro da cavi a cui sono appese le reti tubolari in materiale plastico contenenti i mitili e costituenti le reste. Tale sistema di allevamento è stato sostituito dal sistema a longline o a filari galleggianti, la cui struttura base è composta da due corpi morti di ancoraggio, posti ad una distanza variabile da 100 a 200 m, e collegati tra loro da uno (long-line monoventia) o più cavi (long-line a più ventie o “triestino”), mantenuti in sospensione da una successione di galleggianti ed ai quali sono appese le reste. Il sistema ling-line a monoventia è utilizzato in aree di mare aperto e vanta un’ottima resistenza. Il cavo con le reste si trova ad una profondità che varia da 2 a 5 m, contrariamente, nel sistema long-line a più ventie, i cavi si trovano in prossimità della superficie ed è pertanto utilizzato in aree parzialmente o del tutto riparate (Prioli, 2008). Il reperimento di giovanili può avvenire mediante: captazione naturale nell’ambito dell’allevamento, raccolta su banchi naturali o acquisto presso altri allevamenti. Il seme è successivamente immerso in calze ottenendo reste di lunghezza variabile da 2 a 5 m. L’operazione di incalzo è ripetuta una o due volte nel corso del ciclo produttivo, in relazione all’accrescimento dei mitili ed alla conseguente necessità di ridurne la quantità all’interno delle reste. Una volta raggiunta la taglia commerciale di 50 mm (Reg. CE n. 520/2007), i mitili a seconda della classificazione della zona di produzione (Reg. CE n. 853/2004; Reg. CE n. 854/2004) sono:

- direttamente destinati alla vendita previa rifinitura e confezionamento presso un Centro di Spedizione riconosciuto, se raccolti da zone di classe A;
- immessi sul mercato soltanto dopo aver subito un trattamento in un Centro di Depurazione o previa stabulazione o trasformazione, se raccolti da zone di classe B;
- immessi sul mercato soltanto previa stabulazione di lunga durata o trasformazione, se raccolti da zone di classe C.

La classificazione delle zone di produzione e di stabulazione è basata sulla concentrazione di *Escherichia coli*, valutata mediante un metodo standardizzato (ISO 16649-3), ed adottato come indicatore microbiologico della qualità delle aree destinate alla molluscoltura ed in particolare, come indice di contaminazione fecale (tabella 16).

**Tabella 16** Criteri per la classificazione delle aree di raccolta dei molluschi bivalvi nell'U.E.

CLASSE	STANDARD MICROBIOLOGICO	RIFERIMENTI NORMATIVI	TRATTAMENTO RICHIESTO DOPO LA RACCOLTA
A	$\leq 230$ <i>E. coli</i> per 100 g di polpa e liquido intervalvare	Reg. (CE) 853/2004 Reg. (CE) 854/2004, Reg. (CE) 2073/2005	Nessuno
B	$\leq 4600$ <i>E. coli</i> per 100 g di polpa e liquido intervalvare nel 90% dei campioni. Il rimanente 10% non deve essere $\leq 46000$ <i>E. coli</i> per 100 g di polpa e liquido intervalvare	Reg. (CE) 1021/2008	Depurazione, stabulazione o trasformazione mediante trattamento termico consentito
C	$\leq 46000$ <i>E. coli</i> per 100 g di polpa e liquido intervalvare	Reg. (CE) 853/2004, Reg. (CE) 854/2004	Stabulazione per almeno due mesi o trasformazione mediante trattamento termico consentito
Preclusa	$> 46000$ coliformi fecali	-	Raccolta proibita

La depurazione, accettabile solo per molluschi raccolti in zone di classe B, deve avvenire ininterrottamente per un periodo sufficiente ad ottenere la conformità del prodotto finale allo standard microbiologico stabilito, ai sensi del Reg. (CE) n. 1441/2007, dalla concentrazione di *E. coli*  $\leq 230$  per 100 g di polpa e liquido intervalvare e dall'assenza di *Salmonella* spp. in 25 g di polpa e liquido intervalvare. Sebbene il processo di depurazione sia in grado di garantire l'inattivazione di *E. coli*, tuttavia, relativamente ad altri agenti patogeni (tabella 17) la depurazione, pur riducendone la carica iniziale, non né determina l'inattivazione.

**Tabella 17** Rischi associati al consumo di molluschi bivalvi

PERICOLI	CONTAMINANTI		RIFERIMENTI NORMATIVI
Infezioni	Batteri	<sup>1</sup> <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <sup>1</sup> <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <sup>1</sup> <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<sup>1</sup> Reg. (CE) n. 1441/2007
	Virus	Norovirus, virus dell'Epatite A	-
Intossicazioni	Contaminanti ambientali	Metalli pesanti: <sup>1</sup> Mercurio (Hg), <sup>2</sup> Cadmio (Cd), <sup>1</sup> Piombo (Pb). Inquinanti organici: <sup>3</sup> Diossine, <sup>3</sup> Policlorobifenili (PCB), <sup>4</sup> Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	<sup>1</sup> Reg. (CE) n. 1881/2006, <sup>2</sup> Reg. (CE) n. 629/2008, <sup>3</sup> Reg. (CE) n. 1259/2011; <sup>4</sup> Reg. n. (UE) 835/2001
	Biotossine	PSP ( <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i> ), DSP ( <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i> ), ASP ( <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i> )	Reg. (CE) 853/2004

## 5.5 Buone prassi igieniche ed operative

Gli operatori del settore della molluschicoltura, oltre all'obbligo di allevare o raccogliere i mitili esclusivamente in zone classificate ed autorizzate dall'Autorità competente ai sensi del Reg. (CE) n. 854/2004, devono assicurare l'adozione di comportamenti responsabili, finalizzati sia a garantire la qualità del prodotto allevato dal punto di vista igienico-sanitario e merceologico che la compatibilità con l'ambiente circostante e le altre attività produttive.

La corretta gestione sanitaria nel settore della molluschicoltura occupa un interesse centrale, in considerazione dell'importanza che riveste dal punto di vista socio-economico e delle limitate procedure disponibili atte a ridurre la diffusione degli agenti patogeni.

Tutte le imprese d'acquacoltura, in ottemperanza all'articolo 10 del D.Lgs n. 148/2008, ed al fine di limitare il rischio di contrarre e diffondere le malattie notificabili, devono attuare *prassi igieniche appropriate all'attività in questione*.

L'applicazione delle corrette prassi igieniche, consente la riduzione dei pericoli di origine fisica, chimica e biologica responsabili di stress negli animali allevati, che si traduce, nei molluschi bivalvi, in problematiche di carattere: merceologico, igienico e sanitario e riguardanti la sicurezza alimentare e le produzioni.

Anche se le prassi igieniche descritte in tabella 18, riguardano prevalentemente l'igiene e la sicurezza alimentare, tuttavia, la loro applicazione può ridurre l'esposizione ad agenti di natura chimica e biologica che, esercitando un'azione immunosoppressiva (Adlard & Wesche, 2005), rendono i molluschi allevati, maggiormente suscettibili all'infezione di agenti non zoonosici responsabili delle malattie notificabili.

**Tabella 18** Prassi igieniche in molluschicoltura

FASE PRODUTTIVA	PRASSI IGIENICHE
Ingrasso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mantenimento di adeguate densità di allevamento</li> <li>- Eliminazione di animali morti ed epibionti</li> <li>- Esecuzione di controlli periodici per valutare: l'accrescimento, lo stato di sviluppo, la mortalità, l'integrità delle attrezzature, la densità di allevamento, le specie e la quantità di epibionti e la presenza di parassiti</li> </ul>
Raccolta e lavorazione a bordo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizzo corretto dei macchinari</li> <li>- Utilizzo di tappeti o teli ammortizzanti</li> <li>- Utilizzo di attrezzature aventi materiali lavabili, disinfettabili, resistenti ed atossici</li> <li>- Impiego esclusivo di acqua di mare pulita per la pulizia</li> <li>- Esecuzione della raccolta nelle ore meno calde della giornata</li> <li>- Impiego di tempi ridotti di permanenza a bordo</li> <li>- Osservanza del corretto comportamento igienico del personale</li> <li>- Utilizzo di idoneo abbigliamento da lavoro</li> </ul>
Stoccaggio a bordo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protezione degli animali mediante teli bagnati con acqua di mare pulita o con sistemi ombreggianti</li> <li>- Esecuzione della pulizia delle aree operative e delle attrezzature</li> <li>- Osservanza del corretto comportamento igienico del personale</li> <li>- Utilizzo di idoneo abbigliamento da lavoro</li> </ul>
Sbarco	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Esecuzioni delle operazioni in tempi rapidi</li> <li>- Utilizzo di idonei sistemi protettivi degli animali durante le operazioni</li> <li>- Distribuzione corretta dei carichi</li> <li>- Esecuzione della pulizia delle aree operative e delle attrezzature</li> <li>- Osservanza del corretto comportamento igienico del personale</li> <li>- Utilizzo di idoneo abbigliamento da lavoro</li> </ul>
Trasporto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Esecuzione delle operazioni in tempi rapidi</li> <li>- Esecuzione delle operazioni con attrezzature idonee dotate di: vani di carico isotermici, sistemi di refrigerazione e costituite da materiali lavabili, disinfettabili, resistenti ed atossici</li> <li>- Posizionamento corretto delle confezioni</li> <li>- Esecuzione della pulizia e disinfezione delle attrezzature al termine delle operazioni</li> </ul>

Il mantenimento di elevate densità di allevamento rappresenta il principale fattore di stress, tale da ridurre la vitalità dei molluschi durante la fase d'ingrasso. La conoscenza delle caratteristiche dell'area di allevamento e delle fonti di contaminazione, la valutazione periodica delle mortalità e dell'accrescimento, la rimozione degli animali morti e degli epibionti nonché il corretto smaltimento dei rifiuti della lavorazione, rappresentano prassi igieniche finalizzate a ridurre il rischio di trasmissione delle malattie sostenute da agenti patogeni che riconoscono i molluschi bivalvi come ospiti definitivi.

Attualmente, l'adozione di idonee prassi igieniche ed il controllo delle movimentazioni animali costituiscono le uniche strategie per controllare la Marteiliosi, mentre la raccolta finalizzata al consumo umano o la distruzione dei molluschi bivalvi infetti rappresenta la misura più drastica per prevenirne la diffusione (Berthe et al., 2004).

Tuttavia, ulteriori strategie di gestione sanitaria consistono nell'esecuzione di operazioni, quali la semina e la raccolta, in periodi dell'anno sfavorevoli per lo sviluppo di *Marteilia* spp. riducendo notevolmente il rischio di trasmissione dell'infezione. A tal proposito, in aree endemiche per la Marteiliosi, la semina potrebbe essere evitata nel periodo corrispondente alla maggiore trasmissione di *M. refringens* (Perkins 1993).

Berthe et al. (2004), hanno sostenuto che la conoscenza delle caratteristiche biologiche ed ecologiche del parassita, della distribuzione geografica e temporale delle specie coinvolte nel ciclo vitale e della dinamica della malattia potrebbero rappresentare efficienti strumenti per monitorare la presenza del parassita e per una più efficace gestione sanitaria della molluschicoltura su larga scala (Berthe et al., 1998; Audemard et al., 2001, 2002).

## CAPITOLO VI

### Obiettivi dello studio

Le attività progettuali, in ottemperanza all'attuazione del Piano di Monitoraggio Regionale sulle Malattie dei Pesci e dei Molluschi (autorizzazioni e categorie sanitarie ex D. lgs. 148/08 e del D.D. 31/13), applicato dai Servizi Veterinari dei Dipartimenti di Prevenzione delle AA.SS.LL., ed all'attuazione di programmi di sorveglianza sanitaria, ai sensi dell'art. 11 del D. lgs. 148/2008 hanno inteso:

- fornire dati epidemiologici sulla presenza di *M. refringens* in allevamenti di *M. galloprovincialis* della Regione Campania al laboratorio nazionale di riferimento designato nel C.R.N. per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei e all'Unità Operativa Dirigenziale (U.O.D.) Prevenzione e sanità pubblica veterinaria, della Direzione Generale per la Tutela della salute e il Coordinamento del Sistema Sanitario regionale, del Dipartimento della Salute e delle Riserse Naturali della Regione Campania.
- fornire un servizio diagnostico su campioni ufficiali ed in autocontrollo di *M. galloprovincialis* per la ricerca di *Marteilia* spp.

In considerazione dell'importanza socio-economica del settore della mitilicoltura in Regione Campania, le attività progettuali hanno inteso valutare l'impatto dell'infezione di *M. refringens* dal punto di vista sanitario e zootecnico attraverso:

- la valutazione della prevalenza e dell'intensità dell'infezione di *M. refringens*;
- la caratterizzazione molecolare di *M. refringens*;
- il confronto dei dati di prevalenza dell'infezione di *M. refringens* con la stagionalità e le caratteristiche zootecniche e delle aree di allevamento;
- la valutazione della presenza di fenomeni patologici attribuibili a *M. refringens* e di alterazioni dello stato fisiologico e riproduttivo;
- la valutazione della copresenza di *M. refringens* con altri parassiti;
- la valutazione dell'impatto dell'infezione di *M. refringens* sulla qualità merceologica;
- la valutazione dell'associazione tra l'infezione di *M. refringens* e la qualità dell'ambiente d'allevamento dal punto di vista microbiologico e tossicologico;
- il confronto dei dati ottenuti dai differenti allevamenti.

## CAPITOLO VII

### Materiali e metodi

#### 7.1 Georeferenziazione e descrizione degli allevamenti

Al fine di esaminare la distribuzione geografica della collocazione degli specchi d'acqua classificati e destinati alla molluschicoltura, le coordinate di ciascuna area ed in particolare la latitudine e la longitudine espresse in gradi decimali (DD), stabilite secondo il sistema di riferimento WGS84 (World Geodetic System, Sistema Geodetico mondiale 1984), sono state georeferenziate utilizzando il software EsriArcGIS10 mediante proiezione su figure geometriche poligonali la cui estensione spaziale è definita dai valori delle stesse coordinate.

Le aree di produzione per l'allevamento e la raccolta dei molluschi bivalvi sono distribuite principalmente lungo il litorale della provincia di Napoli e nello specifico, dall'area antistante il litorale di Varcaturò e Licola a Castellammare di Stabia, mentre soltanto un'area destinata alla mitilicoltura insiste sul litorale Domizio (figure 10).

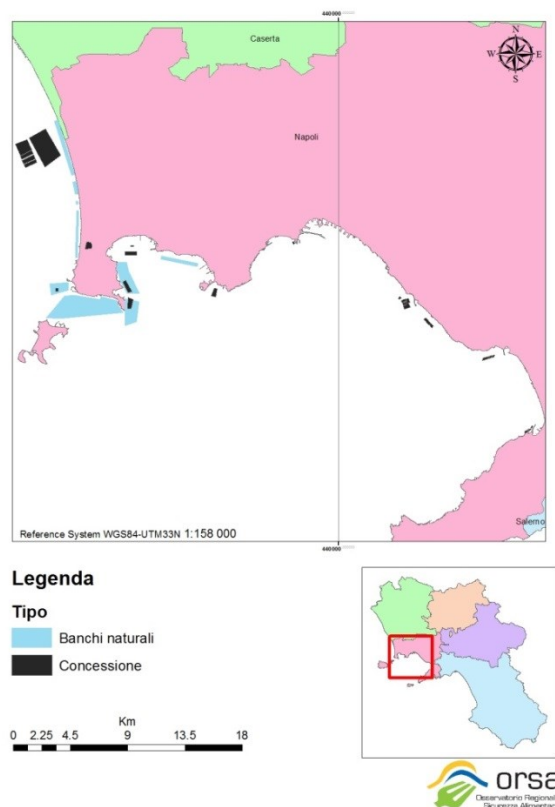
Gli allevamenti monitorati nel corso delle attività sperimentali si trovano in specchi d'acqua che insistono nell'area Flegrea, sul lungomare napoletano e nell'area vesuviana, compresa tra il litorale antistante le città di Portici e Torre Annunziata, e sul lungomare di Castellammare di Stabia (figura 11, 12).

Gli specchi d'acqua in concessione sedi degli allevamenti A, B, C e D insistono lungo il litorale Flegreo, in particolare, l'allevamento A è antistante il litorale di Monte di Procida mentre gli allevamenti B, C e D sono antistanti il lago di Lucrino (figura 11).

Gli specchi d'acqua in concessione sedi degli allevamenti E ed F sono antistanti il lungomare napoletano, in particolare, l'allevamento E è antistante il litorale di Nisida mentre l'allevamento F è antistante Castello dell'Ovo (figure 11, 12).

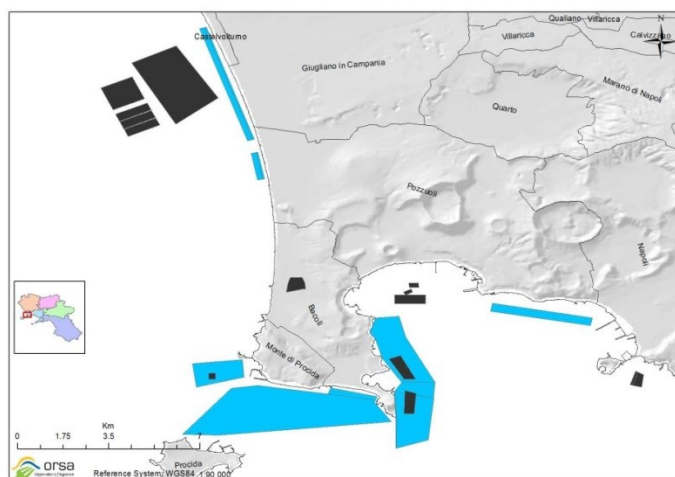
Nell'area vesuviana compresa tra il litorale antistante le città di Portici e Torre Annunziata insistono 4 specchi d'acqua: uno dei quali sede dell'allevamento G, antistante il litorale di Ercolano, due localizzati di fronte il litorale di Torre del Greco e sedi degli allevamenti H ed I e l'ultimo è antistante Capo Oncino e sede dell'allevamento L (figura 12). A sud del litorale campano, in particolare di fronte la Diga Foranea del Porto di Castellammare di Stabia, insiste uno specchio d'acqua in concessione sede dell'allevamento M (figura 12). Ai sensi del Reg. (CE) 853/2004 e del Reg. (CE) 854/2004, l'allevamento B è classificato con stato sanitario A mentre tutti gli altri allevamenti monitorati sono classificati con stato sanitario B. Il sistema di allevamento comune a tutti gli allevamenti è rappresentato dai filari galleggianti o long-line monoventia. Le caratteristiche di ciascun allevamento nonché la profondità e la natura del fondale sono riportate in tabella 19.

**Figura 10** Mappa della distribuzione degli specchi d'acqua classificati per la molluschicoltura lungo il litorale campano (1:158.000)

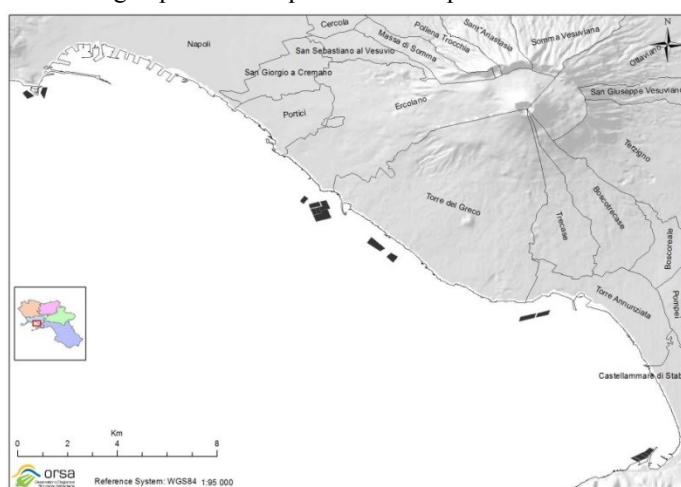




**Figura 11** Mappa della distribuzione degli specchi d'acqua classificati per la molluschicoltura (1:90.000)



**Figura 12** Mappa della distribuzione degli specchi d'acqua classificati per la molluschicoltura (1:95.000)



**Tabella 19** Caratteristiche zootecniche e dei fondali degli allevamenti

ALLEVAMENTO	DISTANZA DALLA COSTA (M)	PROFONDITA' RESTE (m)	PROFONDITA' FONDALE (m)	SUPERFICIE TOTALE DELL'AREA (m <sup>2</sup> )	NATURA FONDALE
A	0,8	5-12	25-30	50.000	Sabbioso
B	0,6	5-12	55-60	270.000	Misto (sabbia, ciottoli)
C	0,8	5-12	25-30	20.000	Misto (sabbia, ciottoli)
D	0,8	5-12	25-30	20.000	Misto (sabbia, ciottoli)
E	0,2	5-20	40-50	150.920	Misto (sabbia, ciottoli)
F	0,1	5-20	40-50	60.000	Misto (sabbia, ciottoli)
G	0,2	5-10	20-25	30.000	Misto (sabbia, fango)
H	0,3	5-10	20-25	241.300	Misto (sabbia, fango)
I	0,3	5-10	20-25	170.000	Misto (sabbia, fango)
L	0,3	5-10	20-25	125.400	Misto (sabbia, fango)
M	0,2	5-10	20-25	144.726	Misto (sabbia, fango)

## 7.2 Ricerca di *Marteilia* spp.

Conformemente a quanto riportato nel Codice di Sanità per gli Animali Acquatici OIE (2015), sono stati destinati 150 mitili alla ricerca di *Marteilia* spp. ed in particolare, 120 sono stati sottoposti ad esame citologico e 30 ad esame istologico. Dopo la rimozione degli epibionti, si è proceduto a recidere i muscoli adduttori ed il legamento elastico, evitando la perforazione degli organi interni, al fine di allontanare le valve tra loro ed accedere alla cavità palleale.

L'esame citologico per apposizione ha previsto, per ciascun mitilo, l'esecuzione di tre impronte della ghiandola digerente su vetrini precedentemente numerati e successivamente asciugati all'aria, fissati in metanolo per 2-3 minuti e colorati mediante kit di colorazione (Hemacolor). La lettura al microscopio ottico è stata eseguita a 20x, 40x ed a 100x. Dopo l'esecuzione delle impronte le ghiandole digerenti, sono state conservate in etanolo assoluto per la successiva caratterizzazione molecolare. L'esame istologico ha previsto, il prelievo dell'intera massa viscerale, mediante la recisione dei punti di attacco del muscolo adduttore all'endostraco, il taglio del bisso e la successiva fissazione in formalina tamponata al 10%, con un rapporto tra volume del campione e volume di fissativo di 1:9 e per un tempo di 24-48 ore. Sono state realizzate sezioni tissutali di 3-4 mm comprendenti le branchie, la ghiandola digerente, il mantello e la gonade, di seguito poste in biocassette che a loro volta sono state collocate nella camera sottovuoto del processatore per l'esecuzione del programma descritto in tabella 20.

**Tabella 20** Programma di processazione

FASE	TEMPO
Alcol etilico 70%	1 ora
Alcol etilico 70%	1 ora
Alcol etilico 96%	1 ora
Alcol etilico 96%	1 ora
Alcol etilico assoluto	1 ora
Alcol etilico assoluto	1 ora
Alcol etilico assoluto	1 ora
Sostituto Xilene	1 ora
Sostituto Xilene	1 ora
Sostituto Xilene	1 ora
Paraffina	1 ora
Paraffina	2 ore
Paraffina	1 ora

Al termine della processazione, le biocassette, sono state poste sulla piastra riscaltata a 60°C per l'inclusione in paraffina e successivamente i campioni inclusi, sono stati posti in congelatore a -20°C. Di seguito, sono state realizzate al microtomo, sezioni seriali di 3 µm distese in bagnetto con acqua distillata a 45°C e poste su vetrini successivamente asciugati su piastra riscaldante. I vetrini sono stati colorati con ematossilina eosina (EE), secondo la procedura descritta in tabella 21. La lettura al microscopio ottico è stata eseguita a 20x e 40x.

Le immagini dei differenti stadi di sviluppo di *Marteilia* spp. sono state ottenute mediante un sistema di acquisizione immagini microscopico (DMD108).

**Tabella 21** Procedura di colorazione

FASE	TEMPO
Sostituto Xilene	10 minuti
Sostituto Xilene	10 minuti
Alcol etilico 96%	3 bagni
Alcol etilico 70%	3 bagni
Alcol etilico 30%	3 bagni
Acqua distillata	5 minuti
Ematossilina di Mayer	3-5 minuti
Acqua corrente	5 minuti
Alcol etilico 96%	3 bagni
Eosina	1-5 minuti
Alcol etilico 96%	3 bagni
Alcol etilico assoluto	3 bagni
Sostituto Xilene	10 minuti
Sostituto Xilene	10 minuti

## 7.3 Caratterizzazione molecolare di *M. refringens*

La caratterizzazione molecolare è stata eseguita mediante analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (PCR-RFLP) descritta da Le Roux et al. (2001). Il DNA è stato estratto da 25 mg della ghiandola digerente, precedentemente conservata in etanolo assoluto, mediante QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). La metodica ha previsto l'impiego di primer aventi come bersaglio, una regione di 412 bp dello spaziatore trascritto interno (ITS-1) di *M. refringens*:

- M2A 5'-CCG CAC ACG TTC TTC ACT CC-3'
- M3AS 5'-CTC GCG AGT TTC GAC AGA CG-3'

Sono stati dispensati 49 µl della mix PCR e 1 µl di DNA estratto per singola colonna PCR. La preparazione della mix PCR è indicata in tabella 22.

**Tabella 22** Preparazione della mix PCR

REAGENTE	VOLUME PER COLONNA	CONCENTRAZIONE FINALE
Buffer (10X)	5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTPs (2 mM)	5 µl	0,2 mM
M2A (100 µM)	0,5 µl	1 µM
M3AS (100 µM)	0,5 µl	1 µM
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH <sub>2</sub> O	32,5 µl	

I cicli di amplificazione sono eseguiti in un termociclatore (PTC-100 MJ Research, Inc. Perkin) ed il programma di amplificazione è riportato in tabella 23.

**Tabella 23** Programma di amplificazione PCR

CICLI, n	FASE	TEMPERATURA	TEMPO
1	Denaturazione iniziale	94°C	10 min
30	Denaturazione	94°C	1 min
	Annealing	55°C	1 min
	Estensione	72°C	1 min
1	Estensione finale	72°C	10 min
1	Refrigerazione	4°C	Infinito

Sono stati usati quali controlli positivi sia DNA genomico estratto da ospiti gravemente infetti sia DNA plasmidico con la regione bersaglio, mentre per il controllo negativo è stata preparata una soluzione di 1 µl di dH<sub>2</sub>O e 49 µl di mix PCR.

La rivelazione del prodotto di amplificazione è stata eseguita mediante elettroforesi multicapillare automatizzata QIAxcel (QIAGEN) e la migrazione delle molecole di DNA è stata convertita in un'immagine mediante software QIAxcel ScreenGel.

Il risultato positivo è un prodotto di amplificazione di 412 bp.

I campioni risultati positivi alla PCR sono stati inviati, per conferma, al C.N.R. per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei e sottoposti a RFLP. Per la RFLP sono stati dispensati 10 µl della mix di restrizione RFLP e 10 µl di amplificato PCR per singola colonna. La preparazione della mix di restrizione RFLP è riportata in tabella 24.

**Tabella 24** Preparazione della mix RFLP

REAGENTE	VOLUME PER COLONNA	CONCENTRAZIONE FINALE
Acqua Molecular Biology Grade (Sigma)	6,8 µl	
Buffer (10X)	2 µl	1X
BSA	0,2 µl	1X
Enzima HhaI	1 µl	20 U

Il programma di restrizione RFLP, in un termociclatore, ha previsto un'incubazione a 37°C per 1 ora e la successiva refrigerazione a 4°C. Il prodotto di amplificazione è stato rilevato in gel di agarosio al 2% e la corsa elettroforetica è stata realizzata ad un voltaggio costante di 4,5 V/cm per 45 minuti. Il campione è considerato positivo per *M. refringens* tipo M se presenta un profilo di restrizione sovrapponibile al profilo del controllo positivo di processo di *M. refringens* tipo M (157 bp + 156 bp + 68 bp + 31 bp). Il campione è considerato positivo per *M. refringens* tipo O se presenta un profilo di restrizione sovrapponibile al profilo del controllo positivo di processo di *M. refringens* tipo O (226 bp + 156 bp + 31 bp).

## 7.4 Valutazione dell'intensità dell'infezione di *M. refringens*

La valutazione del grado dell'infezione di *Marteilia* spp., all'esame istologico, è stata eseguita mediante una scala di valutazione riportata da Villalba et al. (1993a) e caratterizzata da 4 gradi di infezione:

- I assenza di infezione, nessuno stadio di sviluppo di *Marteilia* spp. rilevato;
- II infezione blanda, differenti stadi di sviluppo di *Marteilia* spp. confinati a livello dell'epitelio gastrico;
- III infezione moderata, differenti stadi di sviluppo di *Marteilia* spp. presenti in meno del 10% dei tubuli digerenti;
- IV infezione severa, differenti stadi di sviluppo di *Marteilia* spp. presenti in più del 10% dei tubuli digerenti.

Sono stati inoltre selezionati casualmente 4 tubuli digerenti ed è stato misurato il diametro di ciascuno stadio di sviluppo, mediante un sistema di acquisizione immagini microscopico (DMD108) ed infine sono stati calcolati i valori medi dei valori registrati.

## 7.5 Determinazione del sesso e dello stadio gonadico

La determinazione del sesso e dello stadio di sviluppo gonadico è stata eseguita, all'esame istologico, mediante valutazione: dello sviluppo e della struttura follicolare del tessuto gonadico, della dimensione dei gonodotti, degli stadi di sviluppo delle cellule germinali e dello sviluppo del tessuto connettivo di riserva adipo-granulare (ADH) e vescicolare

(VTC). È stato attribuito, a ciascun individuo, uno stadio di sviluppo gonadico secondo una scala di valutazione modificata di Duinker et al. (2008). La classificazione degli stadi gonadici è riportata in tabella 25.

**Tabella 25** Classificazione e descrizione degli stadi di sviluppo gonadico

STADIO GONADICO	DESCRIZIONE
Stadio I	gonadi a sviluppo precoce, presenza di goni indifferenziati a livello delle pareti dei gonodotti ed abbondante tessuto connettivo di riserva
Stadio II	gonadi mature, presenza di tutta la linea germinale, gonodotti leggermente aumentati di volume e discreta quantità di tessuto connettivo di riserva (ovociti peduncolati/prevalenza di spermatidi rispetto agli spermatozoi)
Stadio III	gonadi a completa maturazione, occupanti massivamente il tessuto palleale, gonodotti dilatati e ridotto tessuto connettivo di riserva (ovociti poligonali/spermatozoi disposti radialmente)
Stadio IV	gonadi in post-emissione, gonodotti dilatati e lume parzialmente o totalmente svuotato e ridotto o discreto tessuto connettivo di riserva (prevalenza di ovociti tondeggianti/spermatozoi disposti radialmente in prossimità delle pareti dei gonodotti)
Stadio V	gonadi in riposo, gonodotti a ridotto diametro o appena rilevabile, assenza di goni sulle pareti ed abbondante tessuto connettivo di riserva

Le immagini dei differenti stadi di sviluppo gonadico sono state ottenute mediante un sistema di acquisizione immagini microscopico (DMD108).

## 7.6 Valutazione della morfometria e delle alterazioni morfologiche

Congiuntamente alle fasi preliminari dell'esame istologico, è stato eseguito un esame anatomopatologico, la cui realizzazione è stata preceduta dalla registrazione, mediante calibro elettronico di precisione, dei rilievi morfometrici quali:

- la lunghezza (il diametro umbo-ventrale);
- la larghezza (il diametro antero-posteriore);
- l'altezza (il diametro latero-trasversale).

Mediante esame esterno sono state registrate le specie, l'abbondanza degli epibionti e l'eventuale presenza di alterazioni morfologiche della conchiglia. Dopo la rimozione degli epibionti è stato misurato il peso di ciascun individuo mediante bilancia analitica elettronica di precisione. Dopo l'accesso alla cavità palleale, è stato eseguito l'esame interno e sono state pesate separatamente le carni e le valve, previo tamponamento su carta assorbente. È stata eseguita una descrizione sistematica delle alterazioni morfologiche, per ognuna delle quali è stata descritta l'estensione, la sede, l'entità e la gravità mediante l'impiego di un microscopio stereoscopico. La descrizione delle eventuali alterazioni morfologiche ha riguardato: l'apparato tegumentario (mantello), l'apparato riproduttivo (gonade), l'apparato locomotore (piede, muscoli adduttori), l'apparato respiratorio (branchie), l'apparato digerente (palpi labiali, ghiandola digerente) e la cavità palleale.

## 7.7 Valutazione dei fenomeni patologici

La valutazione di fenomeni patologici e la presenza di altri agenti di natura parassitaria sono state eseguite mediante esame istologico. È stata eseguita una descrizione sistematica dei fenomeni patologici a carattere difensivo e regressivo, per ognuno dei quali è stata descritta l'estensione, la sede, l'entità e la gravità mediante l'impiego di un microscopio ottico. La descrizione degli eventuali fenomeni patologici e della presenza di altri agenti di natura ha riguardato: il tessuto palleale, il tessuto gonadico, il tessuto muscolare, il tessuto respiratorio ed il tessuto digerente. Le immagini dei differenti fenomeni patologici e dei parassiti rilevati sono state ottenute mediante un sistema di acquisizione immagini microscopico (DMD108).

## 7.8 Valutazione degli indici dello stato fisiologico

Il contenuto d'acqua tessutale, il contributo delle carni rispetto alle valve e rispetto al peso totale sono stati determinati secondo Lucas & Beninger (1985). Lo stato fisiologico è stato determinato attraverso l'indice di condizione (CI) valutato secondo la formula indicata da Lucas & Beninger (1985) ed espressa in percentuale:

$$CI = (\text{peso secco carni} / \text{peso secco valve}) * 100$$

## 7.9 Valutazione degli indici di qualità merceologica

La resa in carne è stata determinata secondo una procedura modificata di Duinker et al. (2008). In particolare, 10 mitili, di ciascun campione, sono stati pesati, mediante bilancia analitica elettronica di precisione, e successivamente sottoposti a cottura mediante ebollizione per 4 minuti. Dopo il raffreddamento sono state separate le carni dalle valve e pesate mediante bilancia analitica elettronica di precisione, previo tamponamento su carta assorbente.

$$\text{Resa in carne (\%)} = \text{peso delle carni dopo ebollizione} * 100 / \text{peso mitilo prima dell'ebollizione}$$

La resistenza delle valve è stata determinata, su 10 mitili, di ciascun campione, mediante Dinamometro Instron Universal Testing Machine (s.5565). È stato misurato lo spessore della valva destra e sinistra di ciascun mitilo, mediante calibro elettronico di precisione, in corrispondenza del punto tangente al piano del pistone. Le valve, poste sul piatto porta campioni, sono state sottoposte ad una compressione alla rottura, con forza di carico di 500 Kg/cm<sup>2</sup>, velocità di 50 mm/min

e percentuale di compressione pari al 2%. I dati relativi al carico alla rottura e dell'energia al picco sono stati registrati mediante il software Merlin.

La sostanza secca è stata determinata sottoponendo le carni di 10 mitili, di ciascun campione, ad essiccamento in stufa alla temperatura di  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , previa omogeneizzazione in mortaio. Successivamente le carni sono state poste in essiccatore, lasciate raffreddare e pesate mediante bilancia analitica elettronica di precisione. Tali operazioni sono state ripetute e fino all'ottenimento del peso costante. La materia secca è stata calcolata mediante la seguente formula, nella quale  $M_1$  rappresenta il peso in g della capsula contenente le carni umide;  $M_2$  il peso in g della capsula contenente le carni essiccate ed  $m$  rappresenta il peso in g della capsula.

Sostanza secca (%) =  $(M_2 - m) / (M_1 - m) * 100$

Dalla sostanza secca è stata ricavata l'umidità come segue:

Umidità (%) =  $100 - \text{sostanza secca} (\%)$ .

Le ceneri sono state determinate sottoponendo le carni di 10 mitili, di ciascun campione, ad essiccamento in stufa alla temperatura di  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per circa 24 ore, previa omogeneizzazione in mortaio. Dopo l'essiccamento, le carni, poste in capsule di quarzo, sono state carbonizzate su piastra e successivamente poste in muffola a  $525 \pm 25^{\circ}\text{C}$ . Dopo 30 minuti le carni sono state estratte dalla muffola, lasciate raffreddare in essiccatore ed infine pesate mediante bilancia analitica elettronica di precisione. Le ceneri sono state calcolate mediante la seguente formula, nella quale  $M_1$  rappresenta il peso in g della capsula contenente le carni umide;  $M_2$  il peso in g della capsula contenente le ceneri ed  $m$  rappresenta il peso in g della capsula.

### 7.10 Ricerca e quantificazione di *E. coli* $\beta$ -glucuronidasi positivo

La ricerca e la quantificazione di *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi positivo sono state determinate mediante metodo ISO 16649-3.

### 7.11 Ricerca e quantificazione di metalli pesanti

Sono stati preparati pool di carni, per ciascun campione di mitili, che sono stati omogeneizzati e  $0,50 \pm 0,01$  g sono stati digeriti con l'aggiunta di 4,0 ml di acido nitrico 70% w/v, 1,5 ml di perossido di idrogeno al 30% v/v e 3,5 ml di acqua ultrapura per spettrofotometria ad assorbimento atomico (MilliQ). Il campione è stato di seguito mineralizzato mediante digestione in microonde ad alta pressione Ethos C (Milestone, FKV, Italia) ad una temperatura di  $190^{\circ}\text{C}$ . Dopo il raffreddamento, i campioni mineralizzati sono stati trasferiti in matracci da 50,0 ml e portati a volume con acqua MilliQ.

La determinazione di mercurio è stata eseguita mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico a vapori freddi, ed una riduzione sodio boridruro, utilizzando spettrofotometro ad assorbimento atomico (modello 3110, Perkin Elmer Italia). La determinazione di piombo e del cadmio è stata eseguita mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornello di grafite come sistema di atomizzazione THGA, con correzione per l'effetto Zeemann, utilizzando l'Analyst 800 (Perkin Elmer, Italia). La quantificazione è stata eseguita dalla standardizzazione esterna con correzione per la percentuale di recupero. Le curve di calibrazione sono state ottenute analizzando soluzioni standard di ciascuno elemento. La concentrazione di ciascun elemento è stata espressa come mg/kg di peso umido, secondo le normative europee (Reg. CE n. 1881/2006; Reg. CE n. 629/2008).

### 7.12 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante software statistico IBM SPSS (vers. 210). Il Chi quadrato ( $\chi^2$ ) di Pearson, è stato utilizzato al fine di rilevare l'associazione tra la presenza di *M. refringens* all'esame citologico e l'allevamento sede del campionamento mentre l'indice Rho ( $\rho_s$ ) di Spearman, è stato utilizzato per rilevare le associazioni tra la presenza di *M. refringens* all'esame citologico e la distanza dalla costa, la distanza dalle fonti di contaminazione degli allevamenti, sedi del campionamento, e gli esiti degli esami citologici. L'indice Rho ( $\rho_s$ ) di Spearman è stato utilizzato anche per rilevare le associazioni tra la presenza di *M. refringens* all'esame citologico ed il mese e la temperatura al campionamento. L'analisi di regressione lineare è stata eseguita al fine di rilevare la relazione tra la variazione della prevalenza dell'infezione di *M. refringens* e la variazione dei parametri morfometrici, degli indici dello stato fisiologico e degli indici di qualità merceologica. L'analisi di regressione lineare ha previsto un modello di regressione nel quale, è stato assunto che la variabile dipendente, ossia la variazione della prevalenza dell'infezione di *Marteilia* spp. all'esame citologico, sia una combinazione lineare di variabili indipendenti, rappresentate dai parametri morfometrici, dagli indici dello stato fisiologico e dagli indici di qualità merceologica. Mediante il rapporto di correlazione Eta quadro, è stata valutata l'intensità della correlazione tra la prevalenza dell'infezione di *M. refringens* e gli esiti degli esami microbiologici e tossicologici.

## CAPITOLO VIII

### Risultati e discussioni

#### 8.1 Prevalenza e stagionalità dell'infezione di *M. refringens*

Dai dati relativi alla prevalenza dell'infezione di *M. refringens* nel corso delle attività sperimentali, si evince presenza del parassita in tutti gli allevamenti monitorati con un valore massimo, registrato per l'allevamento G, pari a 46,67%, ed un valore minimo, registrato per l'allevamento D, pari a 0,83%. La frequente discrepanza tra gli esiti degli esami citologici ed istologici è attribuibile alla differente numerosità campionaria, a tal proposito, la presenza di *M. refringens* è stata rilevata, all'esame istologico, esclusivamente in mitili prelevati negli allevamenti B, E ed F con una prevalenza d'infezione massima, pari a 10,0%, nell'allevamento F, a Settembre del 2015 (26,5°C) ed una prevalenza minima, pari a 3,33%, registrata per lo stesso allevamento, in mitili prelevati a Novembre del 2013 (17°C) (tabella 26).

**Tabella 26** Prevalenza d'infezione, periodo e temperatura

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	T °C	PREVALENZA (%)	
			CITOLOGICO	ISTOLOGICO
A	lug-15	28,5	8,33	0,00
A	dic-15	16	19,17	0,00
B	ott-14	22,5	5,83	3,33
C	nov-14	18	18,33	0,00
D	nov-14	19	7,50	0,00
D	giu-15	24	24,62	0,00
D	set-15	28	0,83	0,00
E	gen-10	15	0,00	3,33
E	ago-14	27	14,17	0,00
E	mag-15	28	1,67	0,00
E	ott-15	24	11,67	0,00
F	nov-13	17	25,83	3,33
F	set-15	26,5	25,83	10,00
G	lug-15	28	46,67	0,00
H	lug-15	28,5	6,67	0,00
I	lug-15	28	15,56	0,00
L	ott-14	22	0,00	0,00
L	giu-15	25	15,83	0,00
M	giu-15	23	0,00	0,00
M	ago-15	27,5	3,85	0,00

Restringendo l'analisi ai soli campionamenti del 2015, l'analisi statistica eseguita mediante il Chi quadrato ( $\chi^2$ ) di Pearson, ha permesso di rilevare un'associazione statisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) tra l'allevamento sede del campionamento e l'esito degli esami citologici (tabella 27).

**Tabella 27** Analisi di associazione tra l'esito al citologico e l'area di prelievo

ESAME	TEST	VALORE	SIG. ASINT. (2 VIE)
Citologico	$\chi^2$ di Pearson	102,988	0,000
	N. esami validi	1249	

Gli esami citologici mostrano prevalenze d'infezione estremamente variabili (tabella 26). In particolare, ad Ottobre del 2014, la prevalenza è risultata di 5,83% (22,5°C) nell'allevamento B e di 0,00% (22°C) nell'allevamento L, a Novembre del 2014, la prevalenza è risultata di 18,33% (18°C) nell'allevamento C e di 7,50% (19°C) nell'allevamento D, malgrado la vicinanza tra i due allevamenti. Le prevalenze d'infezione registrate in mitili a Giugno del 2015, negli allevamenti D, L ed M, sono state pari rispettivamente a 24,62% (24°C), 15,83% (25°C) e 0,00% (23°C), ed infine a Luglio del 2015, negli allevamenti A ed I sono state rispettivamente 8,33% (28,5°C) e 15,56% (28°C). Sebbene gli allevamenti G ed H siano localizzati a poca distanza tra loro, anche se classificati come differenti specchi d'acqua destinati alla mitilicoltura, le

prevalenze d'infezione registrate nello stesso periodo e con una differenza di temperatura pari a 0,5°C sono state estremamente variabili e rispettivamente pari a 46,67% (28°C), 6,67% (28,5°C). In accordo a quanto registrato nel presente studio, la prevalenza d'infezione di *Marteilia* spp. è fortemente influenzata dall'area di allevamento a causa della differente abbondanza degli ospiti intermedi (Diggles, 2013). In particolare, *P. grani* è particolarmente abbondante in aree costiere caratterizzate dall'elevata disponibilità di alimento (Audemard et al., 2002), piuttosto che in zone a maggiore distanza dalla costa (Karagiannis & Angelidis, 2007).

L'indice Rho (ps) di Spearman ha rilevato associazioni statisticamente significative tra la distanza dalla costa e la distanza dalle fonti di contaminazione dell'allevamento, sede del campionamento, e gli esiti degli esami citologici ( $P < 0,01$ ) (tabella 28), pertanto l'allevamento F, localizzato a minore distanza dalla linea di costa (0,1 M) ed a circa 350 m di distanza dalle fonti di contaminazione, mostra un'elevata prevalenza d'infezione, pari a 25,83%, indipendentemente dalla temperatura dell'acqua, in entrambi i periodi di campionamento (tabella 28). La più elevata prevalenza d'infezione (46,67%) è stata registrata nell'allevamento G localizzato a 0,2 M dalla linea di costa ed a circa 500 m di distanza dalle fonti di contaminazione.

In accordo a quanto registrato nel presente studio, Fuentes et al. (1995) e Robledo & Figueras, (1995) hanno dimostrato una maggiore prevalenza d'infezione di *Marteilia* spp. in mitili campionati in aree costiere poco profonde e con abbondante materiale organico (Kim et al., 1998; Powell et al., 1999) tale da favorire lo sviluppo di *P. grani*. Contrariamente, Bigas et al. (2000) hanno sostenuto l'assenza di una relazione tra l'inquinamento organico dell'area di allevamento e la prevalenza del parassita. Invece Rayyan et al. (2006), hanno registrato una prevalenza d'infezione di *Marteilia* spp. elevata, pari a 24,5%, in mitili campionati in un'area sottoposta a maggior inquinamento organico, derivante da attività agricole.

L'indice Rho (ps) di Spearman ha rilevato un'associazione statisticamente significativa tra il mese e la temperatura al campionamento e l'esito all'esame citologico ( $P < 0,01$ ) (tabella 28) ma non con l'esito dell'esame istologico.

**Tabella 28** Analisi di associazione tra l'esito al citologico e le variabili caratterizzanti del campionamento

TEST		VARIABILI			
		T (°C)	MESE	DISTANZA DALLA COSTA (M)	DISTANZA DAI PUNTI DI CONTAMINAZIONE (M)
Rho di Spearman	Coefficiente di correlazione	-0,088	0,074	0,047	0,123
	Sig. (1-coda)	0,001	0,004	0,054	0,001
	N.	1204	1249	1204	615

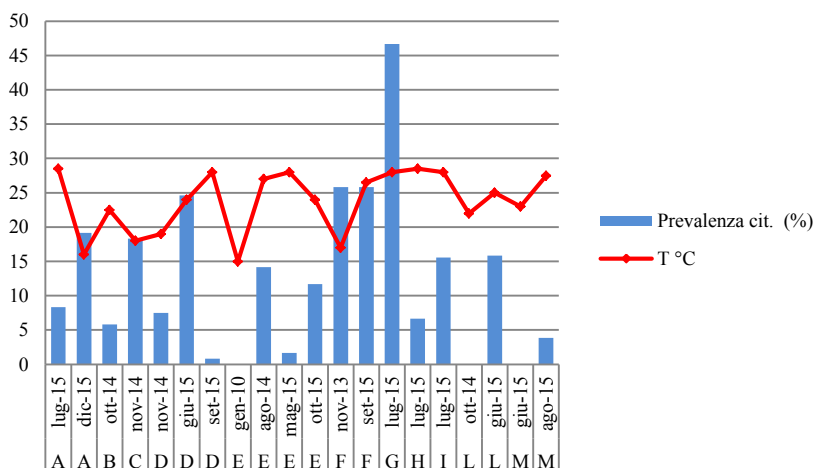
Le attività di monitoraggio eseguite in periodi diversi, nello stesso allevamento, hanno rilevato la presenza costante di *M. refringens*, ad eccezione dell'allevamento L, per il quale è stata registrata, a Giugno del 2015 (25°C), una prevalenza d'infezione pari a 15,83% all'esame citologico e l'assenza del parassita ad Ottobre del 2014 (22°C), sia mediante esame citologico che istologico (tabella 26). Allo stesso modo, l'esame citologico eseguito in mitili prelevati nell'allevamento M, a Giugno del 2015 (23°C), è risultato negativo per la presenza del parassita malgrado, sia stata registrata, per lo stesso allevamento, una prevalenza d'infezione bassa pari a 3,85% nel mese di Agosto del 2015, (27,5°C). L'esame citologico eseguito in mitili prelevati nell'allevamento E, a Gennaio del 2010 (15°C), è risultato negativo per la presenza del parassita malgrado, sia stata registrata una prevalenza d'infezione pari a 3,33% mediante esame istologico. Nell'allevamento E le prevalenze d'infezione registrate, mediante esame citologico, si attestano su valori medi, pari a 14,17% ed a 11,67%, in mitili prelevati rispettivamente ad Agosto (27°C) e ad Ottobre (24°C), mentre la prevalenza d'infezione in mitili prelevati a Maggio (28°C), risulta minore e pari a 1,67%.

Nel presente studio, è stata dimostrata la presenza costante di *M. refringens* nei mitili prelevati durante i periodi invernale ed autunnale con temperature inferiori o pari a 17°C (tabella 26). Tali dati sono in disaccordo con quanto riportato dai dati bibliografici secondo cui, lo sviluppo e la sporulazione del parassita sono favoriti da temperature dell'acqua superiori a 17°C (Balouet, 1977; Grizel, 1985; Audemard et al., 2001) e le basse temperature invernali non favoriscono il completamento dello sviluppo degli sporangi primordiali (Balouet 1979; Berthe et al., 1998).

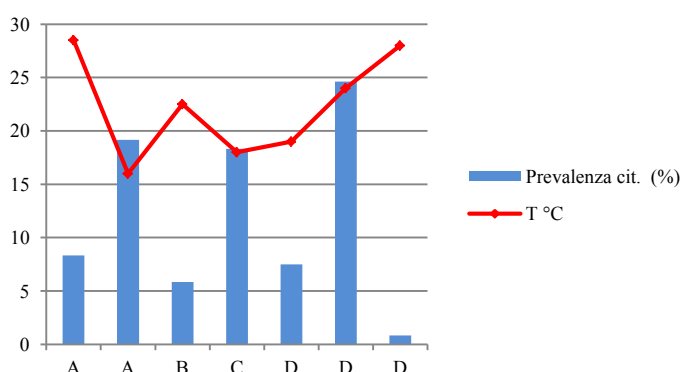
Nel presente studio, la prevalenza d'infezione valutata, mediante esame citologico, in mitili prelevati nell'allevamento F a fine Settembre (26,5°C) ed a fine Novembre (17°C), è risultata tra le più elevate nel corso delle attività di monitoraggio (figura 13). Malgrado la differenza di 9,5°C, la presenza di *M. refringens* è stata registrata con la stessa prevalenza d'infezione, pari a 25,83% in entrambi i periodi di campionamento. La presenza di *M. refringens* è stata registrata in mitili prelevati nell'allevamento A, a metà Dicembre, con temperatura pari a 16°C e con una prevalenza d'infezione pari a 19,17% superiore al valore registrato (8,33%) in mitili prelevati, nello stesso allevamento, a Luglio (28,5°C). Coerentemente, la prevalenza d'infezione, pari a 7,50%, valutata in mitili prelevati nell'allevamento D, a Novembre del 2014, con temperatura dell'acqua pari a 19°C, risulta maggiore rispetto al valore (0,83%) registrato, nello stesso allevamento, ad inizio Settembre, con temperatura pari a 28°C. Tuttavia, per l'allevamento D è stata registrata una prevalenza d'infezione elevata, pari a 24,62%, in mitili prelevati a Giugno (24°C) (tabella 26).

In accordo a quanto registrato nel presente studio, esclusivamente Gombac et al. (2014), hanno registrato una maggiore prevalenza d'infezione di *M. refringens* in popolazioni di *M. galloprovincialis* allevati nel Mare di Slovenia durante i mesi di Dicembre, Gennaio e Febbraio, con temperatura inferiore a 17°C e pari a 9,1°C, rispetto alla prevalenza d'infezione registrata ad Agosto con temperatura pari a 24,1°C.

**Figura 13** Prevalenza d'infezione e temperatura al campionamento



**Figura 14** Prevalenza d'infezione e temperatura al campionamento nell'area Flegrea



Negli allevamenti A, B, C e D, localizzati nell'area Flegrea, la prevalenza dell'infezione di *M. refringens*, si attesta su valori alti con temperature pari a 16°C e 18°C, raggiunge un valore massimo con una temperatura di 24°C (figura 14) e diminuisce con temperature pari a 28 e 28,5°C, dimostrando in tale area un effetto inibitorio delle elevate temperature sulla trasmissione della malattia. In accordo a quanto registrato nel presente studio, numerosi autori hanno riportato che temperature superiori a 25°C provocano, in *Mytilus* spp., una significativa riduzione del tasso di filtrazione (Gonzalez & Yevich, 1976; Bayne et al., 1976; Widdows, 1973) e l'esposizione dei mitili a temperature superiori a 22°C rappresenta un fattore di stress che determina una riduzione del metabolismo (Bayne et al., 1976). La riduzione del processo di filtrazione indotto dalle elevate temperature (28°C, 28,5°C), è in accordo con la ridotta prevalenza d'infezione registrata negli allevamenti dell'area Flegrea, dato che l'assunzione di *Marteilia* spp. ad opera dell'ospite avviene mediante tale processo.

## 8.2 Conferma e caratterizzazione molecolare

I campioni risultati positivi per *Marteilia* spp. all'esame citologico sono stati sottoposti a conferma ed identificazione molecolare mediante PCR i cui prodotti di amplificazione, hanno mostrato una lunghezza di 412 bp (figura 15) sovrapponibile alla lunghezza del controllo positivo di riferimento.

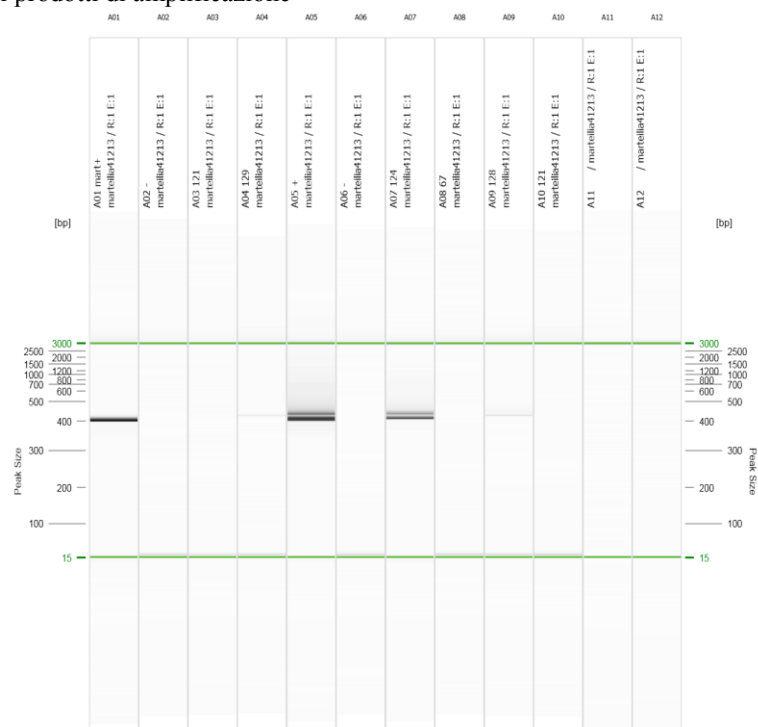
In figura 16 sono riportati l'elettroferogramma del controllo positivo e di un campione di DNA amplificato lungo 412 bp.

I prodotti di amplificazione positivi per *M. refringens* sono stati sottoposti a trattamento con l'enzima di restrizione *HhaI* ed RFLP i cui prodotti di restrizione, hanno mostrato un profilo di restrizione sovrapponibile al controllo positivo di riferimento, individuato dalle bande 156, 157, 68 e 31 bp e corrispondente a *M. refringens* tipo M.

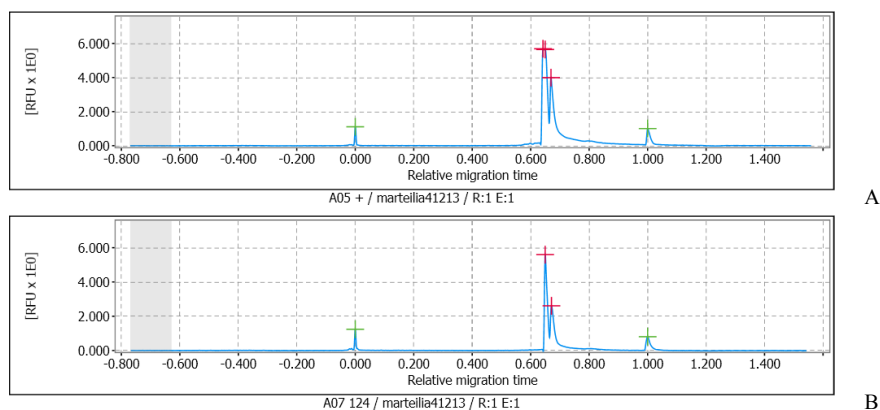
la presenza di *M. refringens* è stata registrata e confermata, mediante TEM e PCR, in *M. galloprovincialis*, lungo la costa atlantica europea e la costa mediterranea marocchina (Comps & Joly, 1980; Villalba et al., 1993b; Robledo et al., 1995a; López-Flores et al., 2004; Novoa et al., 2005). In Italia, Balseiro et al. (2007) hanno dimostrato la presenza di entrambi i genotipi, tipo O e tipo M, di *M. refringens* mediante PCR-RFLP in mitili proveniente dalla Spezia, mentre in accordo a quanto dimostrato nel seguente studio, Carrella et al. (2010b), hanno rilevato la presenza di *M. refringens* tipo M nel Golfo di Napoli e nel Golfo di Salerno.



**Figura 15** Rilevazione dei prodotti di amplificazione



**Figura 16** Picchi di emissione rilevati e tempo di migrazione dei prodotti di amplificazione (A: controllo positivo; B: campione di DNA amplificato lungo 412 bp)



### 8.3 Intensità, stadi di sviluppo e sito d'infezione

I mitili risultati positivi all'esame istologico per *M. refringens* hanno mostrato un grado d'infezione severo (IV) con più del 10% dei tubuli digerenti interessati dalla presenza del parassita (figura 17). Tutti gli stadi di sviluppo sono stati osservati a livello dell'apparato digerente. In particolare, le cellule uninucleate e gli sporangiosori con sporangi primordiali, sono stati osservati alla base delle cellule epiteliali dei tubuli digerenti mentre gli stadi di sviluppo con sporonti primordiali e maturi sono stati rinvenuti in prossimità del lume dei tubuli digerenti (figura 17). I valori medi dei diametri dei differenti stadi di sviluppo di *M. refringens* sono stati riportati in tabella 29

Sono state osservate alcune caratteristiche morfologiche tipiche di *M. refringens*, quali il numero degli sporangi primordiali, pari ad 8 e la presenza di inclusioni eosinofile brillanti che consistono nei corpi rifrangenti (figura 17).

L'osservazione di stadi di sviluppo maturi di *M. refringens* in mitili prelevati a Novembre (17°C), contrasta con quanto riportato da Berthe et al. (2004), che hanno descritto l'assenza di sporonti maturi durante il periodo invernale e la presenza degli sporangi primordiali durante tutto l'anno.

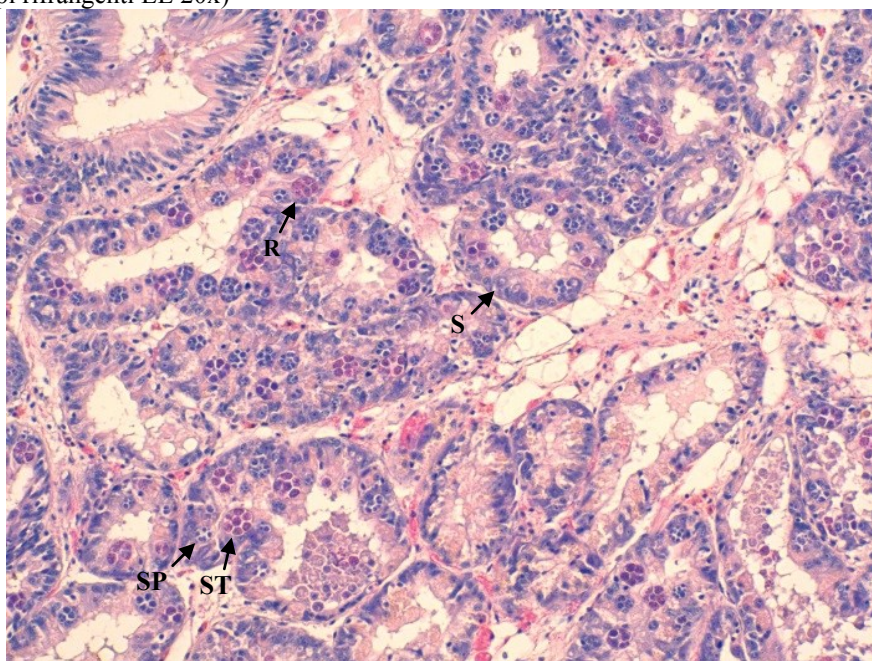
In accordo a quanto osservato nel presente studio, alcuni autori hanno registrato la presenza degli sporonti maturi nel corso dell'intero anno anche se la virulenza di tale stadio di sviluppo non è stata dimostrata durante l'inverno (Robledo & Figueras, 1995; Villalba et al., 1993a; Carrasco et al., 2007).

**Tabella 29** Medie dei diametri degli stadi di sviluppo di *M. refringens*

ALLEVAMENTO	SPORANGIOSORI ( $\mu\text{M}$ )	STADIO A SPORANGI PRIMORDIALI ( $\mu\text{M}$ )	STADIO A SPORONTI PRIMORDIALI ( $\mu\text{M}$ )	STADIO A SPORONTI MATURI ( $\mu\text{M}$ )	SPORE ( $\mu\text{M}$ )
B	7,06	9,17	17,79	23,72	2
E	8,68	13,99	19,74	23,50	1,7
F	9,01	15,56	21,72	27,60	1,9
F	7,47	12,38	18,02	22,76	1,5

Nel presente studio, il rinvenimento di sporonti con spore mature in prossimità del lume dei tubuli digerenti indica un'attiva sporulazione in atto. Inoltre, la presenza di tutti gli stadi di sviluppo di *M. refringens* a livello dei tubuli digerenti, contrasta con quanto osservato negli studi precedenti, che hanno descritto gli stadi di sviluppo primari a livello dei palpi labiali e dello stomaco (Grizel et al., 1974), a livello dell'epitelio branchiale (Robledo & Figueras 1995; Carrasco et al., 2008b) e nel tessuto connettivo del mantello (Garcia et al., 2009) di *Mytilus* spp. Mentre, in accordo a quanto osservato nel seguente studio, Rayyan et al. (2006), hanno dimostrato in *M. galloprovincialis* la copresenza di diversi stadi di sviluppo di *M. refringens* nei tubuli della ghiandola digerente.

**Figura 17** Infezione severa, tubuli digerenti con diversi stadi di sviluppo di *M. refringens* (S: cellula nutrice uninucleata; SP: stadio a sporangi primordiali; ST: stadio a sporonti maturi contenenti spore; R: stadio a sporonti maturi contenenti spore, evidenti i corpi rifrangenti EE 20x)



## 8.4 Stagionalità del ciclo gametogenico

La determinazione del sesso è stata realizzata per gli individui aventi stadio gonadico II, III e IV, dato che, la presenza esclusiva di cellule germinali indifferenziate, localizzate lungo le pareti dei gonodotti (stadio I) e l'assenza di cellule germinali (stadio V), non consentono di discriminare il sesso (tabella 30). Ad eccezione dei campioni di mitili prelevati negli allevamenti G ed M, rispettivamente a Luglio e ad Agosto del 2015, nei quali i sessi sono similmente rappresentati, tutti gli altri campioni di mitili, prelevati nel corso delle attività sperimentali, mostrano una prevalenza maggiore del sesso maschile rispetto al sesso femminile (tabella 30).

**Tabella 30** Numero di femmine, maschi ed individui di sesso non determinato per stadio gonadico

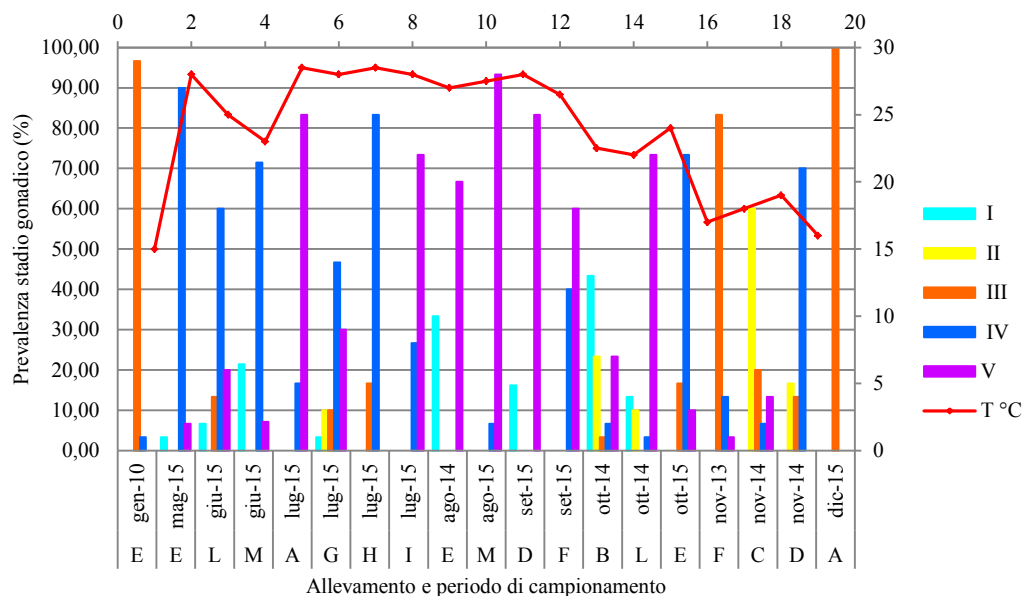
		SESSO							
ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	FEMMINE, n			MASCHI, n			SESSO N.D., n	
		STADIO GONADICO							
		II, n	III, n	IV, n	II, n	III, n	IV, n	I, n	V, n
A	lug-15			1			4		25
A	dic-15		13			17			
B	ott-14	3			4	1	2	13	7
C	nov-14	6			12	6	2		4
D	nov-14	4	1	9	1	3	12		
D	set-15							5	25
E	gen-10		11	1		18			
E	ago-14							10	20
E	mag-15			7			20	1	2
E	ott-15		3	9		2	13		3
F	nov-13		3	1		22	3		1
F	set-15			5			7		18
G	lug-15	1	3	6	2		8	1	9
H	lug-15		3	9		2	16		
I	lug-15			2			6		22
L	ott-14	1			2		1	4	22
L	giu-15		3	5		1	13	2	6
M	giu-15			4			6	3	1
M	ago-15			1			1		28

Il ciclo gametogenico in *Mytilus* spp. è un processo dinamico e continuo, influenzato dall'interazione dei fattori endogeni ed esogeni, variabili con l'area geografica e le differenti condizioni ambientali annuali (Villalba, 1995). I principali fattori che influenzano la funzionalità riproduttiva dei bivalvi sono la temperatura e la disponibilità di cibo (Ceballos-Vázquez et al., 2000; Suárez et al., 2005) che a loro volta regolano la durata delle fasi della gametogenesi, l'emissione gametica (Pazos et al., 1997) e lo sviluppo larvale (Bayne et al., 1976).

Secondo quanto registrato nel presente studio, da Novembre e Gennaio è stata registrata un'intensa gametogenesi e la maturazione gonadica, mentre da Maggio ad Ottobre sono state osservate emissioni gametiche seguite da una lenta fase di ripristino del tessuto gonadico o dal riassorbimento del tessuto gonadico, non seguito dall'inizio di un nuovo ciclo gametogenico (figura 18).

La frequente coesistenza di differenti stadi di sviluppo gonadico osservata in campioni di mitili prelevati in differenti allevamenti e periodi, è il risultato di un'asincronia fisiologica nel ciclo gametogenico ed indica il verificarsi simultaneo delle fasi di emissione gametica e di ripristino del tessuto gonadico (Duinker et al., 2008). La presenza di differenti stadi di sviluppo gonadico, in una popolazione di molluschi bivalvi, può dipendere dall'incidenza delle variazioni termiche e delle caratteristiche idrodinamiche dell'area di allevamento, stimolanti l'emissione gametica (Newell et al., 1982). Contrariamente a quanto descritto da Suárez et al. (2005), l'83,33% dei mitili prelevati a Luglio (28,5°C) nell'allevamento A, ha mostrato gonadi in riposo, in particolare la presenza di follicoli radi, gonodotti di ridotto diametro e l'assenza di goni sulle pareti sono attribuibili ad una completa emissione gametica con l'assenza di una fase di ripristino del tessuto gonadico. Nello stesso gruppo, il 16,67% dei mitili, ha mostrato gonadi in post-emissione con predominanza di ovociti maturi o spermatozoi nel lume dei gonodotti ed una discreta quantità di tessuto connettivo di riserva. Tra i mitili con gonadi in post-emissione, è stato osservato soltanto una femmina, ciò è in accordo con l'asincronia tra i sessi osservata nella fase di emissione gametica attribuita, secondo Suárez et al. (2005), alle elevate temperature inibenti l'ovogenesi.

**Figura 18** Prevalenza degli stadi gonadici e temperatura al campionamento

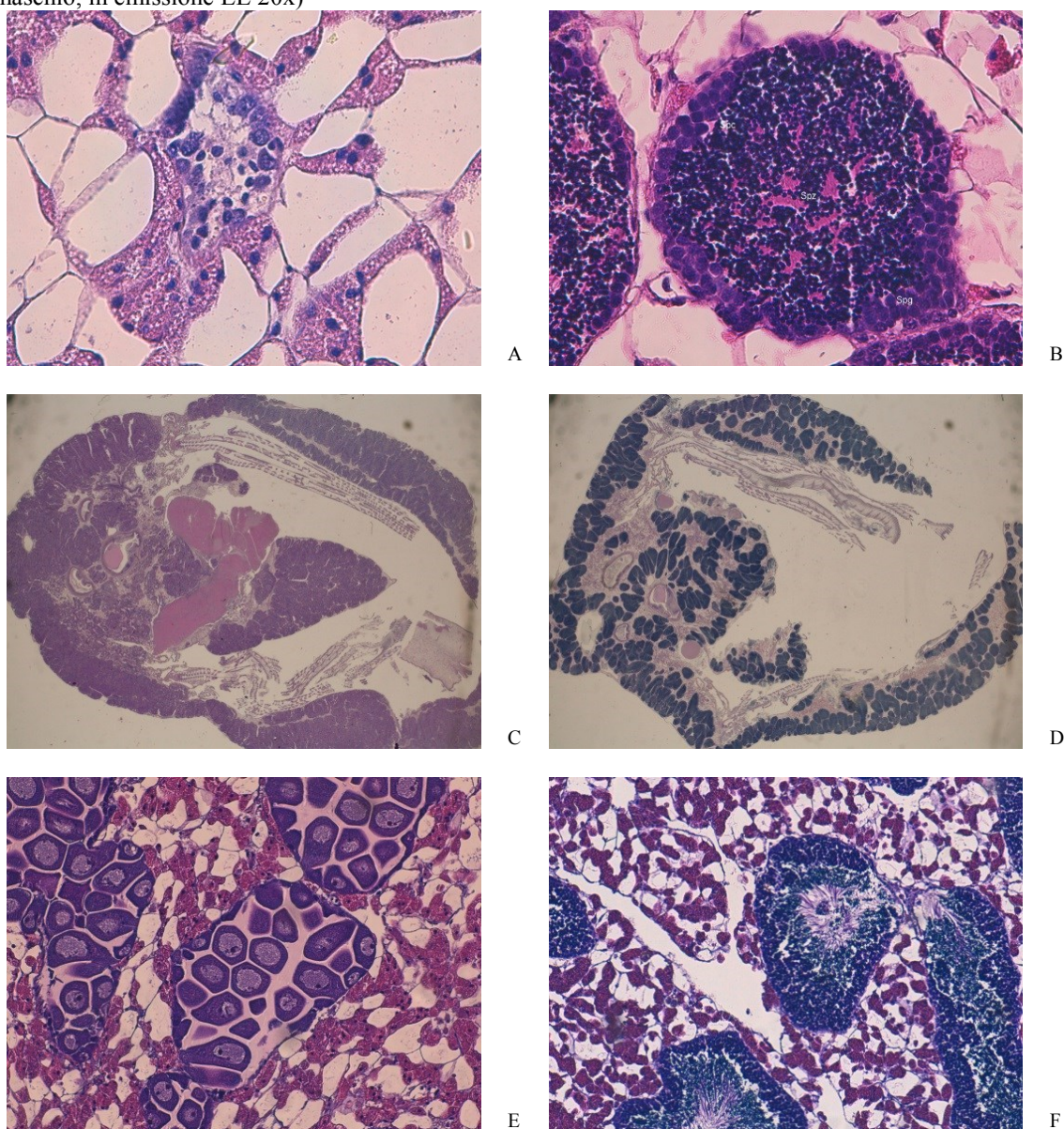


In accordo a quanto descritto precedentemente (Suárez et al., 2005; Duinker et al., 2008), il 100% dei mitili prelevati a Dicembre (16°C) nell'allevamento A, ha mostrato gonadi a completa maturazione e ridotto tessuto connettivo di riserva. Inoltre, è stata osservata una sincronia dei sessi relativamente a tale fase di sviluppo gonadico, non riportata da Suárez et al. (2005). Tra i mitili prelevati ad Ottobre (22,5°C) nell'allevamento B, risultati positivi a *M. refringens* all'esame istologico, sono stati osservati differenti stadi di sviluppo gonadico, in particolare, lo stadio a sviluppo precoce (figura 19) è risultato quello maggiormente rappresentato (43,33%), pertanto la presenza di numerosi goni indifferenziati a livello delle pareti dei gonodotti, l'abbondante tessuto connettivo di riserva e la presenza del 23,33% di mitili aventi gonodotti caratterizzati dalla presenza di tutti gli stadi di sviluppo delle cellule germinali, hanno indicato, contrariamente a quanto dimostrato da Villalba et al. (1993a), la presenza di una fase di ripristino del tessuto gonadico in atto in seguito alla seconda emissione. Tale condizione è osservabile anche in mitili prelevati a Novembre nell'allevamento C (18°C), risultati negativi a *M. refringens* all'esame istologico ed aventi, per il 60,00%, gonadi mature con evidenti tutti gli stadi di sviluppo cellulari e per il 20,00%, gonadi a completa maturazione (figura 19). I mitili prelevati a Novembre del 2014 (19°C) nell'allevamento D, hanno mostrato, per il 70,00%, gonadi in emissione in anticipo rispetto alla stagionalità del ciclo gametogenico, con copresenza di ovociti e spermatidi lungo le pareti dei gonodotti e di ovociti a completa maturazione o spermatozoi nel lume dei gonodotti, mentre per il 16,67%, gonadi mature con evidenti tutti gli stadi di sviluppo cellulari ed infine per 13,33%, gonadi a completa maturazione.

L'83,33% dei mitili prelevati a Settembre del 2015 (28°C) nell'allevamento D, ha mostrato gonadi in riposo, caratterizzate dall'assenza di goni sulle pareti dei gonodotti, mentre solo il 16,67% dei mitili ha mostrato gonadi a sviluppo precoce ed abbondante tessuto connettivo di riserva, indicando una lenta fase di ripristino del tessuto gonadico, tipicamente osservata con le elevate temperature estive (Suárez et al., 2005). In accordo a quanto descritto precedentemente (Suárez et al., 2005; Duinker et al., 2008), il 96,67% dei mitili prelevati a Gennaio del 2010 (15°C) nell'allevamento E, ha mostrato gonadi a completa maturazione e ridotto tessuto connettivo di riserva. Anche in tal caso, è osservata una sincronia dei sessi relativamente a tale fase di sviluppo gonadico, non riportata da Suárez et al. (2005). Malgrado tale gruppo sia risultato positivo a *M. refringens* all'esame istologico, non sono stati osservati alterazioni nel ciclo gametogenico, contrariamente a quanto dimostrato da Villalba et al. (1993a). Malgrado l'elevata temperatura, i mitili prelevati ad Agosto del 2014 (27°C) nell'allevamento E, hanno mostrato per il 33,33%, gonadi a sviluppo precoce con la presenza di goni sulle pareti dei gonodotti, attribuibile al verificarsi di un'intensa attività di ripristino del tessuto gonadico successivo all'emissione gametica. Coerentemente a quanto riportato da Suárez et al. (2005), nel seguente lavoro è stata osservata una notevole asincronia tra i sessi (tabella 30), soprattutto nella fase di emissione gametica, in particolare nell'allevamento E, a Maggio del 2015 (28°C), il 90,00% dei mitili ha mostrato gonadi in post-emissione e tra questi, sono stati registrati 20 maschi e 7 femmine. I mitili prelevati nell'allevamento E, ad Ottobre del 2015 (24°C), hanno mostrato per il 73,33%, gonadi in emissione con la copresenza di ovociti o spermatidi e di ovociti maturi o spermatozoi, tuttavia l'assenza di cellule indifferenziate sulle pareti dei gonodotti dei mitili con gonadi in post-emissione, indica l'assenza di una fase di ripristino del tessuto gonadico.



**Figura 19** Stadi gonadici (A: sviluppo precoce EE 20x; B: maschio, maturazione avanzata EE 20x; C: femmina, maturazione completa EE panoramica; D: maschio, maturazione completa EE panoramica; E: femmina, in emissione EE 20x; F: maschio, in emissione EE 20x)



In accordo a quanto descritto precedentemente (Suárez et al., 2005; Duinker et al., 2008), l'83,33% dei mitili prelevati a Novembre del 2013 (17°C) nell'allevamento F, ha mostrato gonadi a completa maturazione e ridotto tessuto connettivo di riserva. In accordo a Suárez et al. (2005), è osservata asincronia dei sessi relativamente a tale fase di sviluppo gonadico con 22 maschi e 3 femmine. Malgrado tale gruppo sia risultato positivo a *M. refringens* all'esame istologico, non sono stati osservati alterazioni nel ciclo gametogenico, contrariamente a quanto dimostrato da Villalba et al. (1993a). Tra i mitili prelevati a Settembre del 2015 (26,5°C) nell'allevamento F, risultati positivi a *M. refringens* all'esame istologico, sono stati osservati stadi di sviluppo gonadico in post-emissione, in particolare il 60,00% ha mostrato gonadi in riposo, con rare strutture follicolari e gonodotti appena rilevabili e caratterizzati dall'assenza di goni sulle pareti, mentre il 40,00% dei mitili ha mostrato gonadi in emissione con la prevalenza di ovociti maturi o spermatozoi nel lume dei gonodotti. Tale condizione indica, in accordo a quanto dimostrato da Villalba et al. (1993a), l'assenza di una fase di ripristino del tessuto gonadico. I mitili prelevati a Luglio (28°C) nell'allevamento G, hanno mostrato differenti stadi di sviluppo gonadico, in particolare il 46,67% ha mostrato gonadi in emissione, con copresenza di ovociti o spermatidi, lungo le pareti dei gonodotti e di ovociti maturi o spermatozoi nel lume dei gonodotti. Nello stesso gruppo, il 30,00% ha mostrato gonadi in riposo con follicoli radi ed il 10,00%, gonadi mature, pertanto, la presenza di stadi di sviluppo maturi ed in maturazione indica la presenza di una fase di ripristino del tessuto gonadico in atto.

Contrariamente alla stagionalità del ciclo gametogenico (Suárez et al., 2005), i mitili prelevati a Luglio (28,5°C) nell'allevamento H, hanno mostrato per l'83,33% gonadi in emissione con copresenza di ovociti e spermatidi lungo le pareti dei gonodotti e di ovociti maturi o spermatozoi nel lume dei gonodotti e per il 16,63% gonadi a completa maturazione. L'assenza in tale gruppo di mitili con gonadi in sviluppo precoce o in maturazione indica l'assenza di una fase

di ripristino del tessuto gonadico in atto. Tale condizione è stata osservata anche per i mitili prelevati a Luglio (28°C) nell'allevamento I, che hanno mostrato per il 73,33%, gonadi in riposo caratterizzate dalla presenza di follicoli radi e da gonodotti appena apprezzabili e per il 26,67%, gonadi in post-emissione con predominanza di ovociti o spermatozoi maturi in prossimità delle pareti dei gonodotti. I mitili prelevati ad Ottobre del 2014 (22°C) nell'allevamento L, hanno mostrato per il 73,33%, gonadi in riposo, per il 13,33%, gonadi a sviluppo precoce con la presenza di goni indifferenziati a livello delle pareti dei gonodotti ed infine per il 10,00%, gonadi mature con evidenti tutti gli stadi di sviluppo cellulari. Tale condizione indica la presenza di una lenta fase di ripristino del tessuto gonadico in atto. Stessa considerazione risulta valida per i mitili prelevati negli a Giugno negli allevamenti L (25°C) ed M (23°C). Mentre, la presenza del 93,33% dei mitili prelevati ad Agosto (27,5°C) nell'allevamento M, con gonadi in riposo caratterizzate da follicoli radi e gonodotti appena apprezzabili e del 6,67% dei mitili aventi gonadi in post-emissione, con predominanza di ovociti maturi e spermatozoi maturi nel lume dei gonodotti, indica, la presenza di una fase di emissione gametica completa senza ripristino del tessuto gonadico, attribuibile all'elevata temperatura (Suárez et al., 2005). In tabella 31 sono stati riportati lo stadio gonadico ed il sesso dei mitili positivi a *M. refringens*. In particolare, in accordo a Villalba et al., (1993a), su 6 individui 4 mostrano gonadi in post-emissione, a riposo ed a sviluppo precoce e non è stata osservata alcuna differenza nella suscettibilità all'infezione tra i sessi. Inoltre, non sono state osservate differenze nell'abbondanza delle cellule del tessuto connettivo di riserva ADH tra i mitili infetti e non infetti, pertanto, lo sviluppo del tessuto di riserva ADH ha mostrato fisiologicamente un andamento inverso rispetto al ciclo gametogenico. Al Villalba et al. (1993a), che hanno registrato una riduzione nel numero delle cellule ADG, attribuita alla diminuzione dell'assunzione di energia a causa dalla presenza di *M. refringens*.

**Tabella 31** Stadio gonadico e sesso degli individui positivi all'esame istologico

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	FEMMINE, n			MASCHI, n			SESSO N.D., n	
		II	III	IV	II	III	IV	I	V
B	ott-14							1	
E	gen-10					1			
F	nov-13		1						
F	set-15						1		2

## 8.5 Morfometria ed alterazioni morfologiche

Dall'analisi dei dati al 2015, si evince che la variazione della prevalenza dell'infezione di *Marteilia* spp., valutata mediante esame citologico, è significativamente ( $P < 0,01$ ) influenzata dalla variazione delle lunghezze e dell'altezza dei mitili. In particolare è risultata una relazione inversa con la lunghezza ed una relazione direttamente proporzionale con l'altezza. La relazione tra la prevalenza d'infezione e la larghezza dei mitili non è risultata statisticamente significativa (tabella 32).

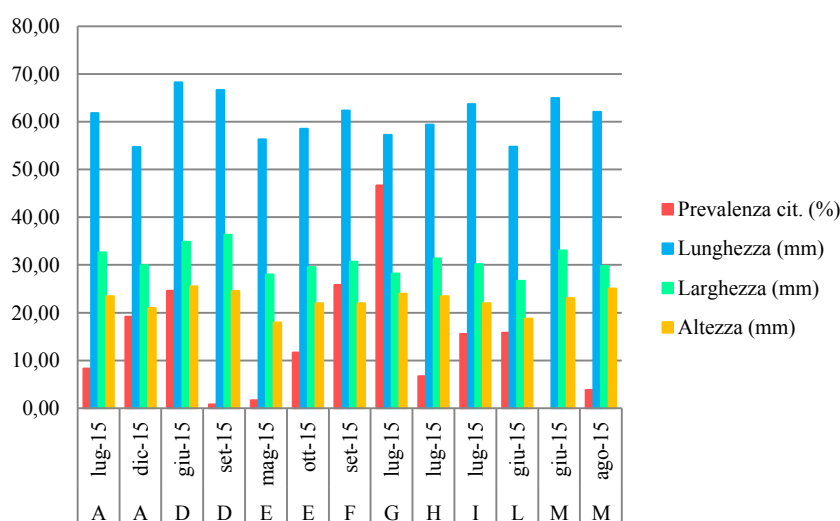
**Tabella 32** Analisi di regressione lineare tra prevalenza d'infezione e parametri morfometrici

MODELLO	COEFFICIENTI STANDARDIZZATI	SIG.
Variabili del modello	$\beta$	
(Costante)		0,710
Lunghezza (mm)	-1,121	0,001
Larghezza (mm)	-0,419	0,071
Altezza (mm)	0,978	0,000

I valori medi dei parametri morfometrici misurati nel corso delle attività sperimentali sono riportati in tabella 33, mentre la relazione di questi ultimi con la prevalenza dell'infezione di *Marteilia* spp. è rappresentata in figura 20.

**Tabella 33** Valori medi dei parametri morfometrici

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	LUNGHEZZA (mm)	LARGHEZZA (mm)	ALTEZZA (mm)
A	lug-15	61,79	32,62	23,46
A	dic-15	54,70	30,00	20,97
D	giu-15	68,24	34,88	25,57
D	set-15	66,63	36,35	24,53
E	mag-15	56,29	28,01	17,97
E	ott-15	58,51	29,59	22,01
F	set-15	62,34	30,72	21,99
G	lug-15	57,23	28,23	23,99
H	lug-15	59,40	31,40	23,44
I	lug-15	63,69	30,20	21,98
L	giu-15	54,78	26,71	18,74
M	giu-15	64,96	33,04	23,04
M	ago-15	62,07	29,79	25,09

**Figura 20** Prevalenza d'infezione e medie dei parametri morfometrici

Una lunghezza maggiore delle valve corrisponde ad una minore massa viscerale, tale condizione si verifica in seguito ad esposizione dei mitili a fattori di stress ed a forte idrodinamismo, in quanto l'energia immagazzinata è utilizzata preferenzialmente per il mantenimento di un metabolismo basale, tale da consentire la sopravvivenza. Pertanto, in tali condizioni, non è utilizzata energia per la gametogenesi e l'accrescimento delle carni. Tuttavia dalla figura 20, si evince che la massima prevalenza d'infezione (46,67%) è stata registrata in mitili prelevati nell'allevamento G, ed aventi una lunghezza media pari a 56,23 mm, mentre la minima prevalenza d'infezione (0,83%) è stata registrata in mitili prelevati nell'allevamento D, ed aventi una lunghezza media pari a 66,63 mm.

La tipologia e l'abbondanza degli epibionti nonché le alterazioni morfologiche e le condizioni fisiologiche sono state riportate in tabella 34.

La presenza discreta o elevata di epibionti è stata registrata nella maggior parte dei campioni esaminati, indicando un elevato trofismo dell'acqua nelle aree di allevamento.

La frequente osservazione, all'esame anatomopatologico, di alterazioni quali: il pallore della ghiandola digerente, l'emaciazione della massa viscerale nonché l'aspetto traslucido del mantello (tabella 34) è in accordo con quanto descritto relativamente ai segni clinici dell'infezione di *M. refringens* in *O. edulis* (Grizel et al., 1974; Grizel, 1985; Berthe et al., 2004). Tuttavia, tali alterazioni risultano aspecifiche, in quanto l'aspetto emaciato e traslucido del mantello è attribuibile allo stadio di sviluppo gonadico, in quanto, ad eccezione dei mitili prelevati a Dicembre nell'allevamento A, che mostrano gonadi a completa maturazione, in tutti gli altri campioni, le fasi di sviluppo di emissione, di post-emissione e di riposo gonadico sono frequentemente rappresentate (tabella 30).

La concavità ed il pallore della ghiandola digerente denotano una scarsa assunzione di alimento tramite filtrazione, attribuibile alle elevate temperature superiori a 25°C (Gonzalez & Yevich, 1976; Bayne et al., 1976; Widdows, 1973), registrate da Giugno a Settembre, dato che non sono state osservate lesioni a carico dell'apparato digerente attribuibili a *M. refringens*, tali da spiegare la ridotta assunzione di alimento.

**Tabella 34** Alterazioni morfologiche ed ebionti

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	ESAME ANATOMOPATOLOGICO		
		ESAME ESTERNO		ESAME INTERNO
		EPIBIONTI	ABBONDANZA EPIBIONTI	
A	lug-15	Cirripedi, serpulidi, alghe rosse	Elevata	Scarsa reattività del piede
				Emaciazione
				Concavità e pallore della ghiandola digerente
	dic-15	Alghe brune	Scarsa	Pigmentazioni focali del piede
D	giu-15	Cirripedi, serpulidi, madreporari, alghe verdi e rosse	Elevata	Aspetto traslucido del mantello
				Scarsa reattività del piede
				Pigmentazioni focali del piede
	set-15	Cirripedi, serpulidi, madreporari, alghe verdi e rosse	Elevata	Emaciazione
				Scarsa reattività del piede
				Legamento elastico lasso
E	ott-15	Cirripedi, alghe verdi	Scarsa	Emaciazione
				Pallore della ghiandola digerente
F	set-15	Cirripedi, serpulidi, alghe rosse	Media	Pigmentazioni focali del piede
G	lug-15	Cirripedi, serpulidi, alghe verdi	Media	Aspetto traslucido del mantello
H	lug-15	Cirripedi, serpulidi, alghe verdi e rosse	Elevata	Branchie e palpi labiali verdi
				Concavità e pallore della ghiandola digerente
I	lug-15	Cirripedi, serpulidi, alghe verdi e rosse	Elevata	Emaciazione
				Concavità e pallore della ghiandola digerente
L	giu-15	Serpulidi, alghe verdi e rosse	Media	Emaciazione
				Aspetto traslucido del mantello
M	giu-15	Cirripedi, serpulidi, alghe verdi e rosse	Media	Scarsa reattività del piede
				Pallore della ghiandola digerente
	ago-15	Cirripedi, serpulidi, madreporari, alghe verdi e rosse	Elevata	Aspetto traslucido del mantello
				Pallore della ghiandola digerente



## 8.6 Fenomeni patologici

I fenomeni patologici rilevati all'esame istologico e valutati nel corso delle attività sperimentali sono stati riportati in tabella 35 e sono prevalentemente riconducibili a:

- fenomeni a carattere difensivo, come le infiammazioni di tipo infiltrativo e nodulare nonché i processi di incapsulazione;
- fenomeni a carattere regressivo, come l'autofagia, l'atrofia, le pigmentazioni endogene, le calcificazioni eterotopiche, la necrosi coagulativa e la degenerazione vacuolare;
- infezioni di natura parassitaria.

**Tabella 35** Descrizione dei fenomeni patologici

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	FENOMENO PATOLOGICO	
		TIPOLOGIA	DESCRIZIONE
A	lug-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori connettivali
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale focale connettivale
		Infezione parassitaria	Cnidari a livello palleale Trematode in gonade
A	dic-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
		Infezione parassitaria	Trematode in stomaco
B	ott-14	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali e periduttali gonadici
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa ed intraduttale gonadica
		Pigmentazione	Accumulo di materiale pigmentato
		Infezione parassitaria	<i>Marteilia</i> spp. nell'epitelio dei tubuli digerenti
			Cnidari a livello palleale Turbellare in intestino
C	nov-14	Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
D	nov-14	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
			Noduli infiammatori interstiziali connettivali
		Calcificazione eterotopica	Mineralizzazione muscolare a livello del piede
		Infezione parassitaria	Trematode intraduttale gonadico
D	set-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
		Pigmentazione	Infiltrazione di materiale pigmentato
		Infezione parassitaria	Trematode intraduttale gonadico
E	gen-10	Infezione parassitaria	<i>Marteilia</i> spp. nell'epitelio dei tubuli digerenti
			Cnidari a livello palleale
E	ago-14	Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
		Infezione parassitaria	Cnidari a livello palleale
E	mag-15	Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica

Segue

Segue tabella 35

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	FENOMENO PATOLOGICO	
		TIPOLOGIA	DESCRIZIONE
E	ott-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
			Noduli infiammatori nell'epitelio intestinale
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
		Autofagia	Autolisi cellulare
		Pigmentazione	Infiltrazione di materiale pigmentato
F	nov-13	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
		Infezione parassitaria	<i>Marteilia</i> spp. nell'epitelio dei tubuli digerenti
			Trematodi in gonade, ghiandola digerente e piede
F	set-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
		Infezione parassitaria	<i>Marteilia</i> spp. nell'epitelio dei tubuli digerenti
			Cnidari a livello palaleale
		Infezione parassitaria, atrofia	Trematodi in gonade e ghiandola digerente, gonodotti degenerati con assottigliamento delle pareti
G	lug-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori connettivali
		Infezione parassitaria	Cnidari a livello palaleale
H	lug-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori connettivali
		Infezione parassitaria	Cnidari a livello palaleale
I	lug-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori connettivali
		Necrosi coagulativa, degenerazione vacuolare	Necrosi e vacuolizzazione delle fibrocellule del piede
		Pigmentazione	Accumulo di materiale pigmentato nel tessuto branchiale
		Infezione parassitaria	Cnidari a livello palaleale
L	ott-14	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori intraduttali gonadici
L	giu-15	Infezione parassitaria	Cnidari a livello palaleale
			Turbellare in tessuto connettivo
M	giu-15	Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
M	ago-15	Infiammazione nodulare	Noduli infiammatori connettivali
		Infiammazione infiltrativa	Infiltrazione interstiziale diffusa gonadica
		Infezione parassitaria	Trematodi in gonade, ghiandola digerente e piede

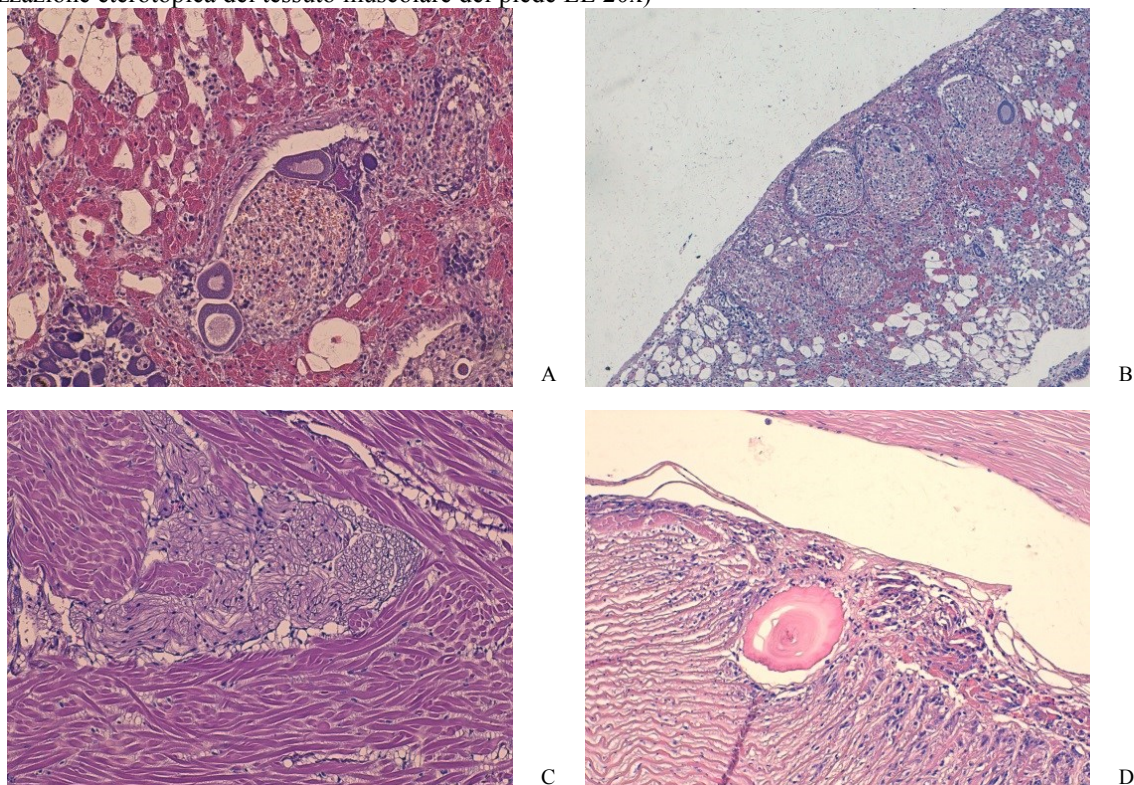
Come si evince dalla tabella 35, i fenomeni patologici più frequentemente evidenziati consistono in fenomeni di natura infiammatoria. In particolare, sono stati osservati emociti infiltranti gli interstizi dei tessuti connettivo e gonadico nonché il lume dei gonodotti, sia in maniera focale che diffusa. Frequentemente sono state osservate invasioni di emociti organizzati in noduli a livello dei tessuti connettivo e gonadico e nel lume dei gonodotti (figura 21). Nell'allevamento D a Novembre del 2014, sono stati osservati noduli infiammatori interstiziali a livello del tessuto connettivo.

Negli individui positivi a *Marteilia* spp., i fenomeni infiammatori di tipo infiltrativo e nodulare sono stati osservati prevalentemente a livello del tessuto gonadico ad eccezione dell'individuo del campione dell'allevamento E, prelevato a Gennaio del 2010, che non mostra alcuna reazione di natura infiammatoria a carico degli organi esaminati.

Malgrado sia stato osservato, un grado d'infezione di *Marteilia* spp. severo, la presenza di *Marteilia* spp. non è stata associata né a fenomeni infiammatori di tipo infiltrativo, nodulare e capsulare né a fenomeni di tipo regressivo a carico della ghiandola digerente.

Contrariamente a quanto osservato nel presente studio, l'infezione di *M. refringens* è stata associata, in *M. galloprovincialis*, ad infiammazioni di tipo infiltrativo, focali e diffuse, nodulari, a livello palaleale ed a carico della ghiandola digerente (Villalba et al., 1993a; Galloway & Depledge, 2001). Sono stati descritti fenomeni necrotici (Villalba et al., 1993a), nonché la distruzione dell'epitelio della ghiandola digerente (Robledo & Figueras, 1995; Karagiannis & Angelidis, 2007), dell'epitelio gastrico e delle ciglia (Figueras et al., 1991).

**Figura 21** Fenomeni patologici (A: nodulo infiammatorio intraduttale gonadico EE 20x; B: infiltrazione interstiziale diffusa e noduli infiammatori gonadici EE 10x; C: degenerazione vacuolare del tessuto muscolare del piede EE 20x; D: mineralizzazione eterotopica del tessuto muscolare del piede EE 20x)

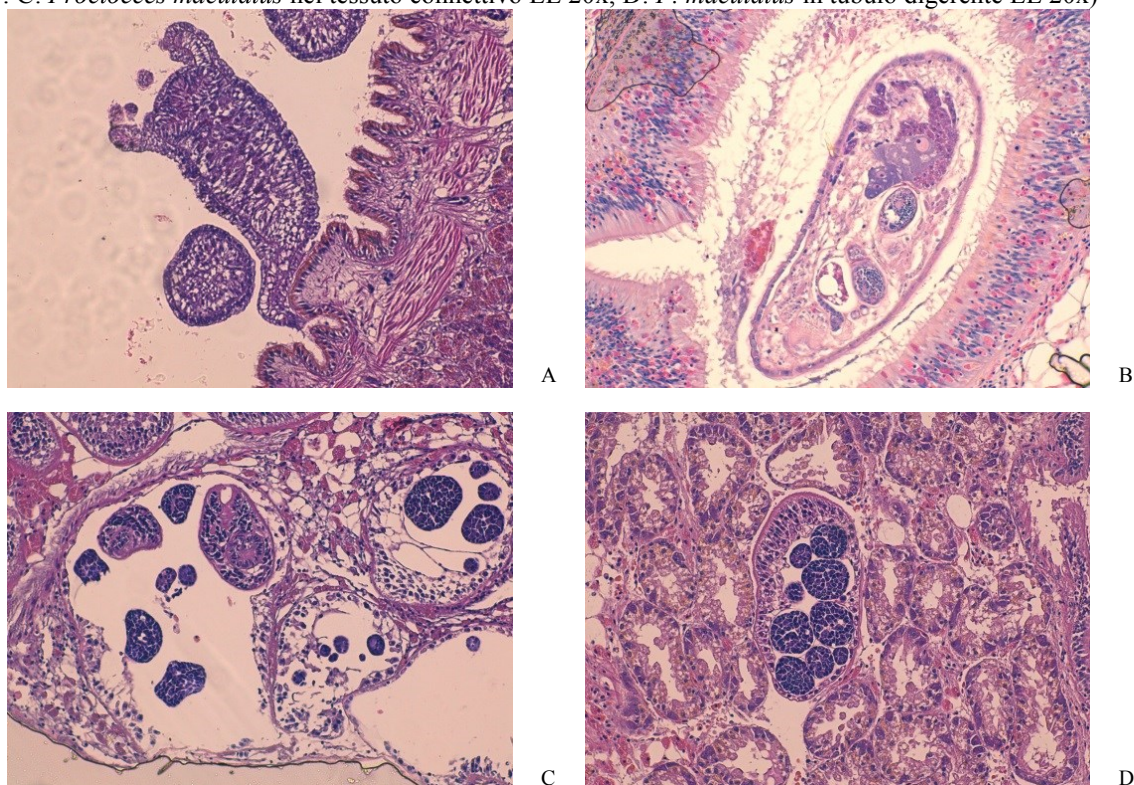


Tra i fenomeni patologici a carattere regressivo, sono stati osservati: necrosi e degenerazione vacuolare a carico del tessuto muscolare del piede con perdita dell'integrità delle fibrocellule con grave scompaginamento tessutale (figura 21). Sono stati registrati anche fenomeni di autolisi cellulare diffusa ed un'area di mineralizzazione eterotopica a carico delle fibrocellule del piede (figura 21). Con maggiore frequenza, sono stati registrati accumuli di materiale pigmentato, sia in forma diffusa che sotto forma di granuli, in alcuni casi associati ai fenomeni infiammatori di tipo infiltrativo e nodulare ed in altri casi attribuibili a pigmenti di natura esogena.

È stata registrata la copresenza di *M. refringens* con altri agenti di natura parassitaria, sia commensali che patogeni (tabella 35). In particolare, con maggiore frequenza è stata osservata la specie commensale *Eugymnanthea inquilina* (figura 22) appartenente alla classe Hydrozoa, sia ancorata mediante il disco pedale al tessuto palaleale sia libera in cavità palaleale. È stata raramente registrata la presenza della specie commensale *Paravortex* sp. (tabella 22) appartenente alla classe Turbellaria nel lume intestinale. Non sono state osservate né alterazioni né risposte difensive a livello tessutale associate alla presenza di tali parassiti. La presenza di differenti stadi di sviluppo della specie *Proctoeces maculatus* (figura 22) appartenente alla classe Trematoda, è stata associata a gravi fenomeni patologici di tipo infiltrativo a carico del tessuto gonadico, del tessuto digerente e del piede, ed in particolare, sono stati osservati gravi degenerazioni del tessuto gonadico, dei gonodotti e processi infiammatori di incapsulazione emocitaria, circondanti i trematodi. È stata osservata la degenerazione dei gonodotti prossimi a metacercarie con atrofia degli epitelii. Tali osservazioni sono in accordo a quanto osservato da Lauckner, (1983) che ha riportato la distruzione del tessuto gonadico ad opera dei trematodi. I fenomeni necrotici sono nei molluschi, biomarcatori di esposizione a fattori di come inquinanti ambientali, ipossia e stress termico (Newman, 2008). Allo stesso modo l'autolisi cellulare può essere indotta nei molluschi da contaminanti ambientali, ipossia, stress osmotico e denutrizione (Moore et al., 2007). La comparsa nei molluschi di fenomeni degenerativi caratterizzati dall'accumulo di granuli giallastri di lipopigmenti, è stata correlata alla presenza di contaminanti ambientali ed all'età dell'animale (Mathew & Damodaran, 1997). Le calcificazioni eterotopiche, sono dovute ad una modifica dei livelli ematici di calcio, indotte da differenti stimoli, che favoriscono la precipitazione di fosfato di calcio nei tessuti (De Vico & Carrella, 2012). Auffret & Oubella (1997) hanno riportato che la formazione di noduli infiammatori può essere modulata dall'esposizione a contaminanti ambientali.



**Figura 22** Parassiti (A: *Eugymnanthea inquilina* ancorato al tessuto palleale EE 20x; B: *Paravortex* sp. nel lume intestinale EE 20x; C: *Proctoeces maculatus* nel tessuto connettivo EE 20x; D: *P. maculatus* in tubulo digerente EE 20x)



### 8.7 Indici dello stato fisiologico

Restringendo l'analisi ai soli campionamenti del 2015, è stata eseguita un'analisi di regressione lineare nella quale la variabile dipendente è la prevalenza dell'infezione di *M. refringens*. In tabella 36 sono stati riportati gli esiti dell'analisi di regressione per gli indici dello stato fisiologico le cui variazioni sono associate significativamente alla variazione della prevalenza dell'infezione di *M. refringens*.

**Tabella 36** Analisi di regressione lineare tra prevalenza d'infezione ed indici di stato fisiologico

MODELLO	COEFFICIENTI STANDARDIZZATI	SIG.
variabili del modello	$\beta$	
(Costante)		0,710
Acqua tessutale (g)	-0,813	0,010
CI (Peso secco carni/Peso secco valve) (g)	-0,692	0,000

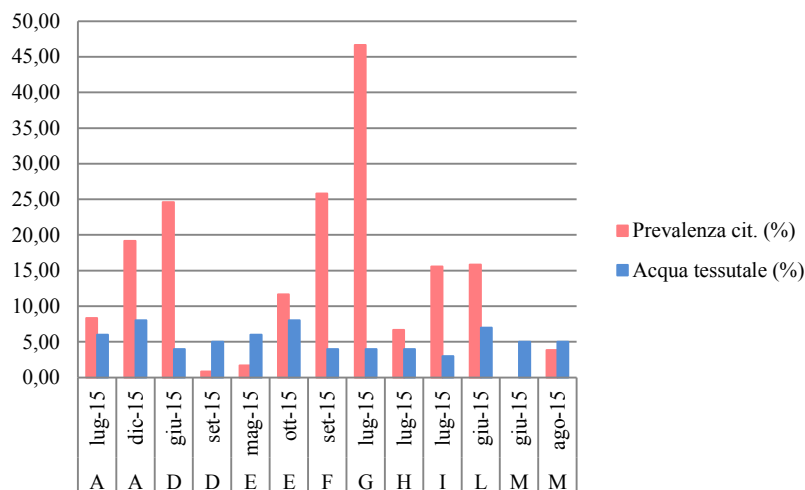
I risultati dell'analisi di regressione lineare e lo studio degli coefficienti standardizzati  $\beta$  (tabella 36), indicano che la variazione della prevalenza dell'infezione di *M. refringens*, è significativamente ( $P < 0,01$ ) influenzata dalla variazione del contenuto d'acqua tessutale, in particolare le due variabili sono inversamente proporzionali. Pertanto, all'aumentare della prevalenza dell'infezione di *M. refringens* diminuisce la quantità d'acqua tessutale e viceversa. Il contenuto d'acqua tessutale si attesta su valori massimi, pari all'8%, nei mitili prelevati nell'allevamento A, a Dicembre e nell'allevamento E ad Ottobre, con prevalenze d'infezione pari rispettivamente a 19,17% e 11,67% (figura 23). Al contrario, il contenuto d'acqua tessutale si attesta su valori bassi, pari al 4%, nei mitili prelevati a Settembre 2015, nell'allevamento F ed a Luglio 2015, nell'allevamento G con prevalenze d'infezione pari rispettivamente a 25,83% e 46,67% (figura 23).

È noto che un'elevato contenuto di acqua nei tessuti è indice della riduzione delle riserve energetiche (Wilkins, 1967; Johnston & Goldspink, 1973), condizione che si verifica in inverno (Beninger & Lucas, 1984).

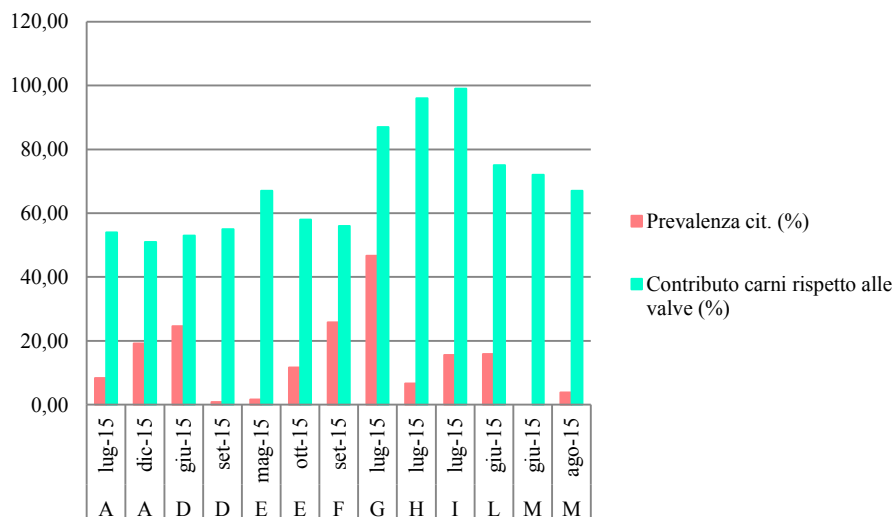
A differenza delle valve, che rappresentano il prodotto della secrezione metabolica e si formano prevalentemente in alcuni periodi dell'anno, la massa viscerale è fortemente influenzata dalla stadio gonadico e dall'attività metabolica (Lucas & Beninger, 1985) dalla disponibilità di alimento, dalla presenza di fenomeni patologici (De Vico & Carrella, 2012).

Le relazioni tra la prevalenza dell'infezione di *M. refringens* ed il contributo delle carni rispetto alle valve (figura 24) e rispetto al peso totale (figura 25) non mostrano andamenti definiti, in particolare, entrambe le variabili si attestano su valori elevati in mitili degli allevamenti G ed H che sono caratterizzati da gonadi mature, in maturazione ed in emissione.

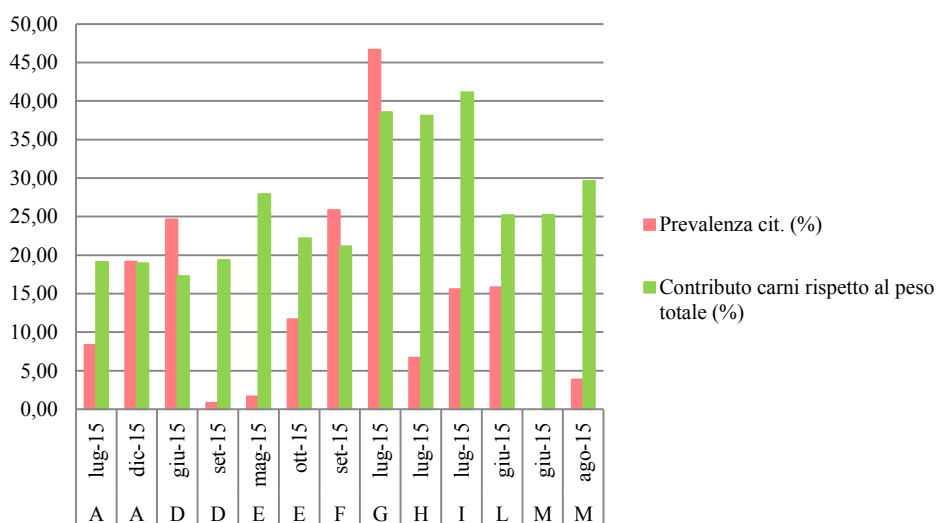
**Figura 23** Prevalenza d'infezione e contenuto d'acqua tessutale



**Figura 24** Prevalenza d'infezione e contributo carni rispetto alle valve



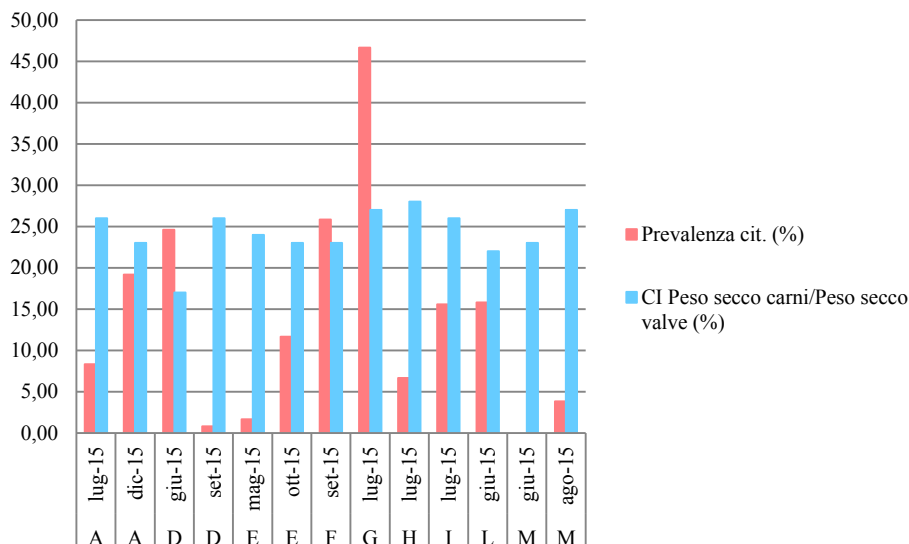
**Figura 25** Prevalenza d'infezione e contributo carni rispetto al peso totale



L'analisi di regressione lineare (tabella 36) ha rivelato che la variazione prevalenza dell'infezione di *M. refringens* è significativamente influenzata ( $P < 0,01$ ) dalla variazione dell'indice di condizione (CI), in quanto le due variabili sono inversamente proporzionali. Il CI si attesta su valori massimi, pari al 28%, nei mitili prelevati nell'allevamento H, con una

prevalenza d'infezione pari a 6,67%, mentre si attesta su valori minimi, pari a 17%, nei mitili prelevati nell'allevamento D a Giugno del 2015, con una prevalenza d'infezione pari a 24,62% (figura 26), indicando che la presenza del parassita determina un minore stato fisiologico dell'ospite. Tuttavia, a differenza degli studi precedenti (Robert et al., 1991; Villalba et al., 1993a, Fuentes et al., 1995) nei quali è stato riportato che la riduzione delle riserve energetiche dell'ospite ad opera di *Marteilia* spp. (Berthe et al., 2004), determina la diminuzione dell'indice di condizione (Figueras et al., 1991), nel presente studio non sono stati registrati fenomeni patologici a carico della ghiandola digerente attribuibili al parassita.

**Figura 26** Prevalenza d'infezione e CI



## 8.8 Indici di qualità merceologica

Restringendo l'analisi ai soli campionamenti del 2015, è stata eseguita un'analisi di regressione lineare nella quale la variabile dipendente è la prevalenza dell'infezione di *M. refringens*. In tabella 37 sono riportati gli esiti dell'analisi di regressione per gli indici di qualità merceologica ed in particolare, la variazione della prevalenza dell'infezione di *M. refringens*, è significativamente ( $P < 0,01$ ) influenzata dalla variazione del carico alla rottura delle valve.

**Tabella 37** Analisi di regressione lineare tra prevalenza d'infezione ed indici di qualità merceologica

MODELLO	COEFFICIENTI STANDARDIZZATI	SIG.
variabili del modello	$\beta$	
(Costante)		0,710
Carico alla rottura (kgf)	-0,397	0,009
Resa in carne (%)	-0,212	0,402

Dai valori riportati in tabella 38 si evidenziano valori bassi del carico alla rottura delle valve in mitili dell'allevamento M in Agosto ed i mitili dell'allevamento L in Giugno hanno evidenziato la presenza di mitili con le valve più fragili ovvero con il più basso valore della forza di carico. L'analisi di regressione tra la prevalenza dell'infezione ed il parametro di resistenza alla rottura delle valve mette in luce che le due variabili sono inversamente proporzionali (tabella 37). Pertanto, all'aumentare della prevalenza dell'infezione di *M. refringens* diminuisce il valore del carico alla rottura delle valve e viceversa (figura 27).

**Tabella 38** Valori medi degli indici di qualità merceologica

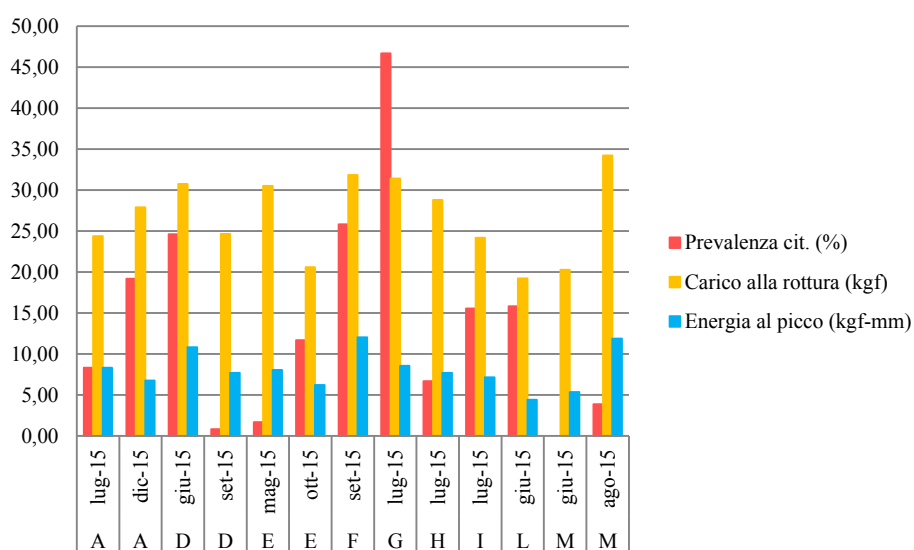
ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	SOSTANZA SECCA CARNI (%)	UMIDITA' CARNI (%)	RESA IN CARNE (%)	CARICO ALLA ROTTURA (kgf)	ENERGIA AL PICCO (kgf-mm)
A	lug-15	24,87	75,13	12,37	24,37	8,32
A	dic-15	22,58	77,42	10,24	27,88	6,76
D	giu-15	16,18	83,82	6,64	30,74	10,82
D	set-15	25,09	74,91	10,31	24,63	7,71

Segue

Segue tabella 38

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	SOSTANZA SECCA CARNI (%)	UMIDITA' CARNI (%)	RESA IN CARNE (%)	CARICO ALLA ROTTURA (kgf)	ENERGIA AL PICCO (kgf-mm)
E	mag-15	23,58	76,42	18,79	30,50	8,05
E	ott-15	21,88	78,12	12,88	20,59	6,19
F	set-15	22,21	77,79	10,84	31,82	12,04
G	lug-15	26,06	73,94	21,17	31,41	8,55
H	lug-15	26,89	73,11	28,10	28,79	7,68
I	lug-15	24,76	75,24	24,36	24,17	7,16
L	giu-15	21,38	78,62	8,76	19,22	4,43
M	giu-15	21,82	78,18	18,05	20,26	5,37
M	ago-15	26,11	73,89	14,31	34,20	11,89

**Figura 27** Prevalenza d'infezione e carico alla rottura valve ed energia al picco



La relazione tra la prevalenza dell'infezione di *Marteilia* spp. e la sostanza secca delle carni non mostra un andamento definito, in particolare, la sostanza secca si attesta su valori massimi, pari a 26,89%, nei mitili prelevati nell'allevamento H a Luglio, con una prevalenza d'infezione pari a 6,67%, mentre si attesta su valori minimi, pari a 16,18%, nei mitili nell'allevamento D a Giugno 2015, con una prevalenza d'infezione pari a 24,62% (tabella 38).

Dai risultati dell'analisi di regressione (tabella 37) si evince che la variazione della prevalenza dell'infezione di *M. refringens*, non è significativamente influenzata dalla variazione della resa in carne.

La relazione tra la prevalenza dell'infezione di *Marteilia* spp. e la resa in carne non mostra un andamento definito. La resa in carne è influenzata fortemente dallo stadio gonadico (Duinker et al., 2008), pertanto mitili con gonadi in piena maturazione hanno una buona resa in carne e migliori caratteristiche organolettiche (Prioli, 2008). Contrariamente, mitili con gonadi in emissione gametica, hanno una scarsa resa in carne e peggiori caratteristiche organolettiche a causa del maggior contributo della ghiandola digerente (Prioli, 2008) sede dell'assorbimento ed immagazzinamento del materiale ingerito (De Vico & Carrella, 2012). Secondo la scala di qualità merceologica proposta da Giulini et al. (2000), per la resa in carne in *M. galloprovincialis*, la maggior parte dei valori registrati nel presente lavoro sono inferiori al 20% ed indicano una resa in carne scarsa. La resa in carne dei mitili dell'allevamento H risulta buona (28,10%), mentre la resa in carne dei mitili degli allevanti G (21,17%) ed I (24,36%) si attesta su valori discreti (tabella 38). La scarsa resa in carne è in accordo con l'aspetto emaciato del mantello osservato in mitili aventi gonadi in emissione o post-emissione.

## 8.9 Parametri microbiologici e tossicologici di qualità dell'ambiente di allevamento

Dai valori assunti dal rapporto di correlazione Eta quadro (tabella 39) si evince che la prevalenza d'infezione di *M. refringens* dipende dalla concentrazione di *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi positivo e dalle concentrazioni di Cadmio, Mercurio e Piombo. Dai valori assunti dal rapporto di correlazione Eta quadro (tabella 40) si evince che la prevalenza d'infezione di *M. refringens* dipende oltre che dalla concentrazione dei contaminanti di natura biologica e chimica, anche dall'area di allevamento. In particolare, nell'allevamento D, si osserva una forte dipendenza tra la prevalenza d'infezione, l'area di prelievo e la concentrazione di *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi positivo e di Cadmio.

**Tabella 39** Misura di associazione tra la prevalenza d'infezione e parametri microbiologici e tossicologici

PARAMETRO	ETA
<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo	0,449
Cadmio	0,838
Mercurio	0,967
Piombo	0,970

**Tabella 40** Misura di associazione tra la prevalenza d'infezione e parametri microbiologici, tossicologici ed area di allevamento

ALLEVAMENTO	PARAMETRO	ETA	ETA QUADRATO
D	<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo	<b>0,948</b>	<b>0,898</b>
	Cadmio	<b>0,910</b>	<b>0,827</b>
	Mercurio	<b>0,405</b>	<b>0,164</b>
	Piombo	<b>0,262</b>	<b>0,069</b>
E	<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo	<b>0,718</b>	<b>0,515</b>
L	<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo	<b>0,293</b>	<b>0,086</b>

I dati relativi alle concentrazioni di *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi positivo, Cadmio, Mercurio e Piombo sono stati riportati in tabella 41, nella quale sono stati raccolti anche i valori dei suddetti parametri, monitorati nelle stagioni precedenti ed antecedenti il campionamento di mitili destinato alla ricerca di *Marteilia* spp.

**Tabella 41** Valori medi degli esiti degli esami microbiologici e tossicologici

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	STAGIONE	PARAMETRI			
			<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo (MPN)	Cadmio (mg/Kg)	Mercurio (mg/Kg)	Piombo (mg/Kg)
B	ott-14	Autunno	20	0,068	0,030	0,245
		Inverno	49	0,128	0,038	0,210
		Primavera	20			
		Estate	30			
C	nov-14	Autunno	158	0,065	0,071	0,320
		Inverno	64	0,055	0,073	
		Primavera	147			
		Estate	748			
D	nov-14	Autunno	145	0,055	0,052	0,309
		Inverno	499	0,060	0,073	0,400
		Primavera	106			
		Estate	5951			
	giu-15	Autunno	48			
		Inverno	175	0,047	0,030	0,372
		Primavera	883			
		Estate	137			
	set-15	Autunno	48			
		Inverno	175	0,047	0,030	0,372
		Primavera	883			
		Estate	137			

Segue



Segue tabella 41

ALLEVAMENTO	MESE/ANNO	STAGIONE	PARAMETRI			
			<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidasi positivo (MPN)	Cadmio (mg/Kg)	Mercurio (mg/Kg)	Piombo (mg/Kg)
E	gen-10	Autunno	20			
		Inverno	50			
		Primavera	75			
		Estate	77			
	ago-14	Autunno	673			
		Inverno	2096			
		Primavera	521	0,082	0,030	0,390
		Estate	673			
	mag-15	Primavera	502			
	ott-15	Primavera	502			
F	nov-13	Autunno	200			
		Inverno	48			
		Primavera	878	0,031		0,141
		Estate	517			
	set-15	Primavera	114	0,054	0,030	0,180
		Estate	84			
L	ott-14	Autunno	1178	0,090	0,030	0,180
		Inverno	1863			
		Primavera	706			
		Estate	3798			
	giu-15	Autunno	840			
		Primavera	2160	0,051	0,030	0,247
		Estate	837			

La presenza di contaminanti ambientali di origine industriale ed agricola è tipicamente registrata nelle aree costiere, in particolare i metalli pesanti possono accumularsi lungo la catena trofica (Mubiana & Blust, 2006) ed i bivalvi, mediante filtrazione, possono assumerli sia dall'acqua che dal particolato sospeso (Usero et al., 2005), bioaccumulandoli a livello tissutale. Nei mitili, i metalli pesanti come il cadmio ed il rame possono inibire l'attività enzimatica coinvolta nella difesa immunitaria (Company et al., 2004). Il mercurio induce alterazioni a livello delle membrane lisosomiali (Marchi et al., 2004).

## CAPITOLO IX

### Conclusioni

Ad oggi, gli studi relativi alla Marteiliosi, hanno riguardato esclusivamente attività di monitoraggio, realizzate sia al fine di ottemperare alle richieste della normativa vigente che per ottenere informazioni riguardanti la distribuzione e la trasmissione della malattia, che rappresenta una problematica per la molluschicoltura ed un potenziale rischio dal punto di vista socio-economico.

I dati relativi alla prevalenza dell'infezione di *M. refringens*, valutati nel presente studio, dimostrano la presenza del parassita in tutti gli allevamenti monitorati. La prevalenza d'infezione è influenzata significativamente dall'area di allevamento, dalla distanza dalla costa e dalla distanza dalle fonti di contaminazione, presumibilmente a causa dell'abbondanza di materiale organico che favorisce lo sviluppo dell'ospite intermedio, il copepode *P. grani*.

In Italia, la caratterizzazione molecolare di *Marteilia* spp. è stata realizzata in pochi studi di monitoraggio e nel presente studio, la caratterizzazione molecolare, mediante PCR-RFLP, ha permesso di rilevare per tutti i campioni analizzati la positività per *M. refringens* tipo M.

La maggior parte degli studi di monitoraggio ha registrato un andamento stagionale dell'infezione di *Marteilia* spp., con un incremento della prevalenza durante i periodi primaverile ed estivo ed una diminuzione durante il periodo invernale. Pertanto, secondo quanto riportato nel Manuale di Diagnosi per gli Animali Acquatici OIE (2015) e nella Decisione di esecuzione 2015/1554/UE, in vigore dal 1 Aprile 2016, il campionamento delle specie sensibili a *M. refringens*, deve essere eseguito nel periodo di massima prevalenza dell'infezione, ed in assenza di tali informazioni, quando la temperatura dell'acqua supera i 17°C.

Tuttavia, nel presente studio è stata dimostrata la presenza costante di *M. refringens* durante l'inverno e l'autunno e con temperature inferiori o pari a 17°C. Un particolare andamento della prevalenza dell'infezione di *M. refringens* è stato osservato nei allevamenti dell'area Flegrea, dove la prevalenza d'infezione si attesta su valori alti a temperature pari a 16°C e 18°C, raggiunge un valore massimo a 24°C, per poi diminuire con temperature pari a 28 e 28,5°C. Tali dati dimostrano, in quest'area, un effetto inibitorio delle elevate temperature sulla trasmissione della malattia, attribuibile ad una riduzione del tasso di filtrazione, evidenziabile dalla valutazione della ghiandola digerente, all'esame anatomopatologico.

Numerosi autori hanno descritto l'assenza di sporonti maturi durante il periodo invernale, mentre nel presente studio, all'esame istologico, è stata dimostrata la presenza di tutti gli stadi di sviluppo di *M. refringens*, nelle cellule epiteliali dei tubuli digerenti. Pertanto, la presenza di sporonti, contenenti spore mature, localizzati in prossimità del lume dei tubuli digerenti, dimostra il completamento dello sviluppo degli sporangi primordiali, con un'attiva sporulazione in atto anche a temperature inferiori a 17°C.

La presenza di *M. refringens* è stata registrata prevalentemente in mitili con gonadi in emissione o in riposo, confermando che lo stress legato all'emissione gametica determina la compromissione del sistema immunitario e pertanto, la maggiore sensibilità all'infezione. La presenza di *M. refringens* non è stata associata ad alterazioni della funzionalità riproduttiva e non sono state osservate significative differenze nell'abbondanza delle cellule del tessuto connettivo di riserva ADH, tra i mitili infetti e non infetti, dimostrando che la presenza del parassita non incide sull'assorbimento di energia da parte dell'ospite. A conferma di ciò, la presenza di *M. refringens* non è stata associata né a fenomeni infiammatori di tipo infiltrativo, nodulare e capsulare né a fenomeni di tipo regressivo a carico della ghiandola digerente, tali da spiegare alterazioni nel processo di assorbimento dei nutrienti.

La prevalenza dell'infezione di *M. refringens* è influenzata significativamente dal contenuto d'acqua tissutale e dal CI indicando, pertanto un minore stato fisiologico dei mitili, tuttavia, sebbene il grado d'infezione, valutato all'esame istologico, sia risultato severo, non è stata osservata la presenza di fenomeni patologici a carico della ghiandola digerente attribuibili ad una ridotta assunzione di alimento.

Malgrado non siano mai stati investigati gli effetti di *M. refringens* sulla resistenza delle valve, nel presente studio è stata dimostrata una relazione inversamente proporzionale tra la prevalenza d'infezione ed il carico alla rottura delle valve, in accordo alle ridotte riserve energetiche disponibili per l'attività metabolica.

Il contributo della massa viscerale e la resa in carne risultano maggiormente influenzati dallo stadio gonadico e dall'attività metabolica, dalle elevate temperature e dalla presenza di fenomeni patologici.

Nel presente studio è stata osservata la copresenza di *M. refringens* con parassiti commensali, come l'idrozoo *E. inquilina* ed il turbellare *Paravortex* sp., mentre la presenza di differenti stadi di sviluppo del trematode *P. maculatus*, è stata associata a gravi fenomeni patologici di tipo infiltrativo a carico del tessuto gonadico, del tessuto digerente e del piede, ed in particolare, sono stati osservati gravi degenerazioni del tessuto gonadico, dei gonodotti e processi infiammatori di incapsulazione emocitaria, circondanti i trematodi.

I fenomeni patologici a carattere regressivo, come la necrosi, la degenerazione vacuolare e l'autolisi cellulare, ed i numerosi fenomeni infiammatori di tipo nodulare sono stati attribuiti ad esposizione a contaminanti ambientali. Pertanto, la compromissione del sistema immunitario dei mitili, causata da una scarsa qualità dell'ambiente di allevamento, è in accordo con la maggiore sensibilità all'infezione di *M. refringens*. L'associazione tra la prevalenza d'infezione di *M. refringens* e la concentrazione di *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi positivo, indice di inquinamento organico e di contaminazione fecale, è in accordo con elevate prevalenze d'infezione, registrate in allevamenti localizzati a distanza minore dalle fonti di contaminazione, ed attribuite alla maggiore abbondanza dell'ospite intermedio *P. grani*.

La presenza costante di *M. refringens*, evidenziata in 11 allevamenti del litorale campano, con prevalenze d'infezione medio alte e con intensità d'infezione severa, anche nel periodo invernale, l'assenza di eventi di mortalità, registrati nel corso delle attività sperimentali e l'assenza di fenomeni patologici indotti dal parassita, indicano che *M. refringens* non altera l'assunzione di alimento e/o l'assorbimento di nutrienti. I mitili impiegano le riserve energetiche per sostenere la risposta immunitaria indotta dai parassiti trematodi e dalla scarsa qualità dell'ambiente d'allevamento, mentre risulta presumibile lo stabilirsi di un equilibrio ospite-parassita, tra *M. galloprovincialis* e *M. refringens*.

Data la differente sensibilità all'infezione di *Marteilia* spp. delle specie sensibili elencate o meno nell'allegato IV parte II del D.Lgs n. 148/2008, delle numerose specie appartenenti all'ordine *Paramyxida* e delle notevoli movimentazioni di molluschi bivalvi tra i Paesi membri dell'U.E., risulta opportuno un monitoraggio di minima, anche delle specie non elencate, al fine di poter tempestivamente registrare eventuali eventi di morbosità e mortalità. Inoltre la disponibilità di dati epidemiologici, risulta necessaria al fine di ottemperare alle prescrizioni per la movimentazione dei molluschi bivalvi a scopo di allevamento ai sensi dell'articolo 16 del D.Lgs. n. 148/2008.

Il verificarsi della sporulazione di *M. refringens* nel periodo invernale e la riduzione della prevalenza a temperature elevate, mettono in luce la possibilità di pianificare i programmi di campionamento per l'attuazione di programmi di sorveglianza sanitaria, ai sensi dell'art. 11 del D.Lgs. 148/2008 e la stagionalità delle ispezioni, per l'attuazione dei Piani Regionali Integrati futuri, finalizzati alla verifica dei requisiti sanitari previsti dallo stesso atto legislativo.

## BIBLIOGRAFIA

- Adlard RD, Wesche SJ (2005) Aquatic animal health subprogram: Development of a disease zoning policy for *Marteilia sydneyi* to support sustainable production, health certification and trade in the Sydney rock oyster. Queensland Museum, Brisbane pp. 1-46.
- Adlard RD, Nolan M (2015) Elucidating the life cycle of *Marteilia sydneyi* the aetiological agent of QX disease in the Sydney rock oyster *Crassostrea glomerata*. Int J Parasitol 45 (6): 419-426.
- Alderman DJ (1979) Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. Mar Fish Rev 41: 67-69.
- Allam B, Paillard C, (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. Dis Aquat Org 33: 123-128.
- Anderson RS, Wesche SJ, Lester RJG (1994) Are outbreaks of *Marteilia sydneyi* in Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*, triggered by a drop in environmental pH? Aust J Mar Freshwater Res 45: 1285-1287.
- Anestis A, Pörtner HO, Karagiannis D, Angelidis P, Staikou A, Michaelidis B (2010) Response of *Mytilus galloprovincialis* (L.) to increasing seawater temperature and to marteliosis: Metabolic and physiological parameters. Comp Biochem Physiol Part A 156: 57-66
- Arzul I, Chollet B, Boyer S, Bonnet D, Gaillard J, Baldi Y, Robert M, Joly J, Garcia C, Bouchoucha M (2014) Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. Parasitol 141 (2): 227-240.
- Audemard C, Barnaud A, Collins CM, Le Roux F, Sauriau PG, Coustau C, Blanchier P, Berthe FCJ (2001) Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. J Exp Mar Biol Ecol 257: 87-108.
- Audemard C, Le Roux F, Barnaud A, Collins C, Sautour B, Sauriau PG, De Montaudouin X, Coustau C, Combes C, Berthe F (2002) Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. Parasitol 124: 315-323.
- Auffret M, Oubella R (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp Biochem Physiol 118A (3): 705-712.
- Auffret M, Poder M (1983) Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. Rev Trav Inst Pêches Mar 47: 105-109.
- Auffret M, Poder M (1987) Pathology of the main bivalve molluscs species from oyster rearing areas in Brittany (France). Aquaculture 67: 255-257.
- Balouet G (1977) *Marteilia refringens*-considerations of the life cycle and development of Abers disease in *Ostrea edulis*. Haplosporidian and Haplosporidian-like Diseases of Shellfish, International Symposium, vol. 41. Virginia Institute of Marine Science, Gloucester Point, VA, pp. 64-66.
- Balouet G (1979) *Marteilia arefringens*- Considerations of the life cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. Mar. Fish. Rev. 41: 64-66.
- Balseiro P, Montes A, Ceschia G, Gestal C, Novoa B, Figueras A (2007). Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update. Bull Eur Ass Fish Pathol 27 (4): 148-156.
- Bayne LB, Bayne JC, Carefoot CT, Thompson JR (1976) The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad 1. Metabolism and energy balance. Oecologia (Berl.) 22: 211-228.
- Bellou M, Kokkinos P, Vantarakis A (2013) Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. Food Environ. Virol. 5: 13-23.
- Ben-Horin T, Bidegain G, Huey L, Navaez DA, Bushek D (2015) Parasite transmission through suspension feeding. J. Invertebr. Pathol. xxx:xxx-xxx.
- Berthe FCJ, Pernas M, Zerabib M, Haffner P, Thebault A, Figueras AJ (1998) Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life cycle. Dis Aquat Org 34: 135-144.
- Berthe FCJ (2000) Development and validation of DNA-based diagnostic techniques with particular reference to bivalve mollusc pathogens. In: DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and disease. FAO Fish. Tech. Pap. 395: 64-70.
- Berthe F, Le Roux F, Adlard R, Figueras A (2004) Marteliosis in Molluscs: a review. Aquat Living Resour 17: 433-448.
- Bigas M, Sagristà E, Bozzo MG, Durfort M, Poquet M (2000) Occurrence of heavy metals and protozoan parasites in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, collected in the western Mediterranean. Ecotoxicol Environ Saf 3: 16-21.
- Boyer S, Chollet B, Bonnet D, Arzul I (2013) New evidence for the involvement of *Paracartia grani* (Copepoda, Calanoida) in the life cycle of *Marteilia refringens* (Paramyxia). Int J Parasitol 43 (14): 1089-1099.
- Bower SM Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Marteilia refringens/maurini* of Mussels (2011) <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mrmaurmu-eng.html>.
- Bougrier S, Tige G, Bachere E, Grizel H (1986) *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. Aquaculture 58: 151-154.
- Brillant MGS, MacDonald BA (2000) Postingestive selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin): the role of particle size and density. J Exp Mar Biol Ecol 253: 211-227.
- Brillant MGS, MacDonald BA (2003) Postingestive sorting of living and heat-killed *Chlorella* within the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin). J Exp Mar Biol Ecol 290: 81-91.

- Bushek D, Ford SE, Chintala MM (2002) Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Dis Aquat Org* 51: 217-225.
- Butt D, Raftos DA (2007) Immunosuppression in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) and QX disease in the Hawkesbury River, Sydney. *Mar Freshwater Res* 58: 213-221.
- Butt D, Shaddick K, Raftos DA (2006) The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 251: 159-166.
- Camacho A, Villalba A, Beiras R, Labarta U (1997) Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* LINNAEUS) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens* (Grizel et al.) and *Myticola intestinalis* (Steven). *J Shellfish Res* 16: 77-82.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech*. 57:469-476.
- Canesi L, Pezzati E, Stauder M, Grande C, Bavestrello M, Papetti A, Vezzulli L, Pruzzo C (2013) *Vibrio cholerae* interactions with *Mytilus galloprovincialis* hemocytes mediated by serum components. *Front Microbiol* 4: 371.
- Carballal MJ, Villalba A, Lopez C (1998) Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 72: 304-312.
- Carella F, Aceto S, Marrone R, Maiolino P, De Vico G (2010b). *Marteilia refringens* infection in cultured and natural beds of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) along the Campanian coast (Tirrenian sea, South of Italy). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 30 (5): 189-196.
- Carrasco N, López-Flores I, Alcaraz M, Furones MD, Berthe F, Arzul I (2007). Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitol* 134:11, 1541-1550.
- Carrasco N, Arzul I, Chollet B, Robert M, Joly J-P, Furones MD, Berthe FCJ (2008a) Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *M. maurini*. *J Fish Dis* 31: 497-504.
- Carrasco N, Arzul I, Berthe FCJ, Furones MD (2008b) In situ hybridization detection of *Marteilia refringens* (Paramyxea) initial infective stages in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J Fish Dis* 31 (2): 153-157.
- Carrasco N, Hine M, Durfort M, Andree KB, Malchus N, Lacuesta B, González M, Roque A, Rodgers C, Furones MD (2013a) *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture* 412-413, 223-230.
- Carrasco N, Furones MD, Arzul I, Lacuesta B, Voorbergen-Laarman M, Engelsma M (2013b) A competitive real-time PCR for *Marteilia refringens* detection and discrimination of the genotypes “O” and “M”. In: 16th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, EAFP, Abstract Book p-226, September 2013, Tampere (Finland).
- Carrasco N, Green T, Itoh N (2015) *Marteilia* spp. Parasites in bivalves: A revision of recent studies. *J Invertebr Pathol* 131: 43-57.
- Casas SM, Villalba A, Reece KS (2002a) Study of perkinsosis in the carpet shell clam in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis Aquat Org* 50: 51-65.
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 73: 203-266.
- Cavalier-Smith T, Chao EEY (2003) Phylogeny and classification of the Phylum Cercozoan (Protozoa). *Protist* 154: 341-358.
- Ceballos-Vázquez BP, Arellano-Martínez M, García-Domínguez F, Villalejo-Fuerte M (2000) Reproductive cycle of the rugose pen shell, *Pinna rugosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: Bivalvia) from Bahía Concepción, Gulf of California and its relation to temperature and photoperiod. *J Shellfish Res* 19 (1): 95-99.
- Ceschia G, Mion A, Orel G, Giogetti G (1992) Parasitological research in mussel cultures in Friuli-Venezia Giulia (northeast Italy). *Boll Soc Ital Patol Ittica* 24-36.
- Ceschia G, Zanchetta S, Sello M, Montesi F, Antonetti P, Figueras A (2001) Presence of parasites in razor clam (*Ensis minor* and *Ensis siliqua*) harvested from coastal areas of the southern Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* 13: 20-27.
- Chatton E (1911) Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxea paradoxa*, n.g., n.sp.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de paris* 152: 631-633.
- Chu F-LE, Lund ED (2006) Viability, infectivity and fatty acid synthetic activity of *Perkinsus marinus* meront cells incubated in estuarine and artificial seawater. *Dis Aquat Org* 71: 131-139.
- Company R, Serafima A, Bebianno MJ, Cossonb R, Shillitoc B, Fiala-Médionid A (2004) Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar Environ Res* 28: 377-381.
- Comps M (1970) Observations sur les causes d'unemortalitéanormal des huîtres plates dans le bassin de Marennes *Rev Trav Inst PêchesMarit* 34: 317-326.
- Comps M (1976) *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev Trav Inst Pêches Mar* 40: 347-349.
- Comps M, Joly JP (1980) Experimental contamination of *Mytilus galloprovincialis* LmK by *Marteilia refringens*. *Sci Peche* 19-21.

- Comps M, Grizel H, Papagianni Y (1982) Parasitic diseases due to *Marteilia maurini* sp. in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. ICES Copenhagen Denmark, p. 3.
- Comps, M (1983) Morphological study of *Marteilia christiensi* sp. n. parasite of *Scrobicularia piperata* P. (mollusk pelecypod). Rev Trav Inst Peches marit 47: 99-104.
- Comps M, Park MS, Desportes I (1986) Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n. g., n. sp. parasite des ovocytes de l'huitre *Crassostrea gigas*. Th Protistologica 22: 279-285.
- Dahl SF, Thiel J, Allam B (2010) Field performance and QPX disease progress in cultured and wild-type strains of *Mercenaria mercenaria* in New York waters. J Shellfish Res 29: 83-90.
- Dec. di esecuzione della commissione, 2015/1554/UE recante modalità di applicazione della direttiva 2006/88/CE per quanto riguarda le prescrizioni in materia di sorveglianza e di metodi diagnostici, n. L. 247 del 11 settembre 2015
- Desportes I, Perkins FO Phylum Paramyxea. In: L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman (Eds.), Handbook of Protoctista. Boston, Jones and Bartlett Publishing, 1990 pp. 30-35.
- De Vico G, Carrella F. Argomenti di Patologia Comparata dei Molluschi, Aspetti Ecologici e Sanitari, eds., Loffredo Editore 2012.
- Diggles BK (2013) Historical epidemiology indicates water quality decline drives loss of oyster (*Saccostrea glomerata*) reefs in Moreton Bay, Australia. New Zeal J Mar Fresh Res 47: 561-581.
- Dir. del Consiglio 91/67/CEE Norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L. 46 del 19 febbraio 1991.
- Dir. del Consiglio 93/54/CEE, recante modifica della direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 175 del 14 dicembre 1993.
- Dir. del Consiglio 95/22/CE, recante modifica della direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 243 del 11 ottobre 1995.
- Dir. del Consiglio 95/70/CE che istituisce misure comunitarie minime di lotta contro talune malattie dei molluschi bivalvi. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L. 332 del 30 dicembre 1998.
- Dir. del Consiglio 2006/88/CE relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L. 328 del 24 novembre 2006.
- D.Lgs. 4 agosto 2008, n. 148 "Attuazione della direttiva 2006/88/CE relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie".
- Dobson A (2004) Population dynamics of pathogens with multiple host species. Am. Nat. 164:564-578.
- Dove MC, Nell JA, O'Connor WA (2013) Evaluation of the progeny of the fourth generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (*Marteilia sydneyi*) and winter mortality (*Bonamia roughleyi*). Aquacult Res 44 (11): 1791-1800.
- D.P.R. 91/67/CEE Regolamento per l'attuazione della direttiva che stabilisce norme di polizia sanitaria per i prodotti di acquacoltura Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. 284 S.O. del 4 febbraio 1993.
- D.P.R. del 30 dicembre 1992, n. 555 Regolamento per l'attuazione della direttiva 91/67/CEE che stabilisce norme di polizia sanitaria per i prodotti di acquacoltura Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. 28 S.O. del 4 febbraio 1993.
- D.P.R. del 20 ottobre 1998 n. 395 Regolamento recante norme di attuazione della direttiva 95/70/CE in materia di misure minime di lotta contro talune malattie dei molluschi bivalvi. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. 270 del 18 novembre 1998.
- Duinker A, Liv H, Hovgaard P, Mortensen S (2008) Gonad development and spawning in one and two year old mussels (*Mytilus edulis*) from Western Norway. J Mar Biol Assoc U.K. 88 (7): 1465-1473.
- Elgharsalli R, Aloui-Bejaoui N, Salah H, Chollet B, Jolu JP, Røvert M, Couraleau Y, Arzul I (2013) Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. J Invert Pathol 112 (2): 175-183.
- Ercolini C, Ceschia G, Campo Dall'Orto B, Terarolli A, Marchis D and Prearo M (2004) Presenza di *Marteilia* spp. in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) d'allevamento nelle acque litoranee della Liguria orientale. Ittiopatologia 1: 127-134.
- Feist SW, Hine PM, Bateman KS (2009) *Paramarteilia canceri* sp. n. (Cercosoa) in the European edible crab (*Cancer pagurus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. Folia Parasitol 56: 73-85.
- Fernández Robledo JA, Vasta GR, Record NR (2014) Protozoan parasites of bivalve molluscs: literature follows culture. PLoS One 9, e 100872.
- Franc A (1980) On some aspects of the cycle of *Marteilia refringens* Grizel and Col., a parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. Cah Biol Mar 21: 99-106.
- Fuentes J, Villalba A, Zapata C, Alvarez G (1995) Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Myticola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). Dis Aquat Org 21: 221-226.

- Fuentes J, López J, Mosquera E, Vazquez J, Villalba A., Alvarez G (2002) Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ria de Arousa (NW of Spain). *Aquaculture* 213: 1-4.
- Galinou-Mitsoudi S, Petridis D (2000) Biometry and growth of the horse mussel *Modiolus barbatus* in the gulf of Thessaloniki. 9<sup>th</sup> Hellenic Congress of Ichthyologists, Messologi. Book of Abstracts (in Greek), Greek Ichthyologists Union, Athens, Greece, pp. 25-28.
- Galloway TS, Depledge MH (2001) Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.
- Garcia C, Arzul I, Robert M, Chollet B, Joly JP, Miossec L, François C (2009) Detection of atypical *Marteilia refringens* in mussels, *Mytilus edulis* in France. In: 101st Annual Meeting National Shellfisheries Association (NSA), Savannah, Georgia, March 2009, 22-26.
- Giulini G, Mietti N, Maffei M (2000) Determinazione dei parametri qualitativi del prodotto ittico per la definizione di standard di qualità. Rap MiPAF, DGPA IV P. T. Pesca e Acquacoltura.
- Gombac M, Kusar D, Ocepek M, Pogacnick M, Arzul I, Couraleau Y, Jencic V (2014) Marteilirosis in mussels: a rare disease? *J Fish Dis* 34 (9): 805-814.
- Gonzalez JG, Yevich P (1976) Responses of an estuarine population of the blue mussel *Mytilus edulis* to heated water from a steam generating plant. *Mar. Biol.* 34: 177-189.
- Green TJ, Dixon TJ, Devic E, Adlard RD, Barne AC (2009) Differential gene expression of antioxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol* 26: 799-810.
- Green TJ, Barnes AC (2010). Reduced salinity, but not estuarine acidification, is a cause of immune suppression in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Mar Ecol Prog Ser* 402: 161-170.
- Green TJ, Raftos D, O'Connor W, Adlard RD, Barnes AC (2011) Disease prevention strategies for QX disease (*Marteilia sydneyi*) of Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *J Shellfish Res* 30: 47-53.
- Grizel H, Comps M, Bonami JR, Cousserans F, Duthoit JL, Pennec M (1974) Epizooty of the common oyster *Ostrea edulis*, Part 1. Study of the agent of digestive gland disease in *Ostrea edulis* Linne *Sci Pêche* 240-241, 1-30.
- Grizel H (1979) *Marteilia refringens* and oyster disease - recent observations. *Mar Fish Rev* 41: 38-39.
- Grizel H, Comps M, Raguene D, Leborgne Y, Tige G, Martin AG (1982) Results of acclimatization experiments of *Ostrea chilensis* on the Brittany coasts. *Rev Trav Inst Peches Marit* 46: 209-225.
- Grizel H (1985) Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thesis doctoral, Département de Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Hall SR, Sivars-Becker L, Becker C, Duffy MA, Tessier AJ, Caceres CE (2007) Eating yourself sick: transmission of disease as a function of foraging ecology. *Acol. Lett.* 10: 207-218.
- Herrbach B (1971) Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne. *Rev Trav Inst Peches Marit* 35: 79-87.
- Hughes FM, Foster B, Grewal S, Sokolova IM (2010) Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immun* 29: 247-257.
- Imanaka S, Itoh N, Ogawa K, Wakabayashi H (2001) Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasyo Bay, Mie, Japan. *Fish Pathol* 36: 83-91.
- Itoh N, Oda T, Ogawa K, Wakabayashi H (2002) Identification and development of a paramyxean ovarian parasite in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Pathol* 37: 23-28.
- Itoh N, Oda T, Yoshinaga T, Ogawa K (2003a) Isolation and 18S ribosomal DNA gene sequences of *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxia), an ovarian parasite of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* 54: 163-169.
- Itoh N, Oda T, Yoshinaga T, Ogawa K (2003b) DNA probes for detection of *Marteilioides chungmuensis* from the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Pathol* 38: 163-169.
- Itoh N, Komiyama H, Ueki N, Ogawa K (2004a) Early developmental stages of a protozoan parasite, *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxia), the causative agent of the ovary enlargement disease in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Int J Parasitol* 34: 1129-1135.
- Itoh N, Yamamoto T, Kang HS, Choi KS, Green TJ, Carrasco N, Awaji M, Chow, S (2014) A novel paramyxean parasite, *Marteilia granula* sp. Nov (Cercaria), from the digestive gland of *Manila clam*, *Ruditapes philippinarum*, in Japan *Fish Pathol* 49 (4): 181-193.
- ISO 16649-3:2015 Microbiology of the food chain, Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*, Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide.
- Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Gu X, Read A, Go J, Dove M, O'Connor W, Kirkland PD, Frances J (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OshV-1 u-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Org* 105: 109-126.
- Johnston IA, Goldspink G (1973) Some effects of prolonged starvation on the metabolism of the red and white myotomal muscle of the plaice *Pleuronectes platessa* *Mar Biol* 19 (4): 348-353.
- Jones BJ, Creeper J (2006) Diseases of pearl oyster and other molluscs: a western Australian perspective. *J Shellfish Res* 25: 233-238.
- Jørgensen CB (1996) Bivalve filter feeding revisited. *Mar Ecol Prog Ser.* 142 (13): 287-302.

- Karagiannis D, Angelidis P (2007) Infection of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* by the protozoan *Marteilia* sp. In the Thermaikos Gulf (N Greece). Bull Eur Ass Fish Pathol 27 (4): 131-141.
- Kim Y, Powell EN, Wade TL, Presley BJ, Sericano J (1998) Parasites of sentinel bivalves in the NOAA Status and Trends Program: distribution and relationship to contaminant body burden. Mar Pollut Bull 37: 45-55.
- Kleeman SN, Adlard RD (2000) Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. Dis Aquat Organ 40: 137-146.
- Kleeman SN, Adlard RD, Lester RJG (2002a) Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. Int J Parasitol 32: 767-784.
- Kleeman SN, Roux FL, Berthe FCJ, Adlard RD (2002b) Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. Parasitol 125: 131-141.
- Lester RJG (1986) Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In: Cremin, M., Dobson, C., Moorhouse, D.E. (Eds.), Parasite Lives. University of Queensland Press, Brisbane, pp. 33-40.
- Le Roux F, Audemard C, Barnaud A, Berthe F (1999) DNA Probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. Marine Biotechnol 1: 588-597.
- Le Roux F, Lorenzo G, Peyret P, Audemard C, Figueras A, Vevares C, Gouy M, Berthe F (2001) Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. J Eukaryot Microbiol 48: 449-454.
- Limpanont Y, Kang HS, Hong HK, Jeung HD, Kim BK, Le TC, Kim YO, Choi KS (2013) Molecular and histological identification of *Marteilioides* infection in Suminoe Oyster *Crassostrea ariakensis*, Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* and Pacific Oyster *Crassostrea gigas* on the south coast of Korea. J Invertebr Pathol 114: 277-284.
- Longshaw M, Feist SW, Matthews A, Figueras A (2001) Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) form *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. Dis Aquat Org 44: 137-142.
- López C, Darriba S (2006) Presence of *Marteilia* sp. (Paramyxea) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). J Invertebr Pathol 92: 109-111.
- López-Flores I, de la Herrán R, Garrido-Ramos M, Navas J, Ruiz-Rejon C, Ruiz-Rejon M (2004) The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on their DNA IGS sequence. Parasitol 129: 411-419.
- López-Flores I, Robles F, Valencia JM, Grau A, Villalba A, de la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Navas JI (2008a) Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridisation in *Chamelea gallina* from Balearic Islands (Spain). Dis Aquat Org 82: 79-87.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Navas JI (2008b) Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and in situ hybridization. Mol Cell Probes 22: 151-155.
- Lucas A, Beninger P (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture. 44: 187-200.
- MacCready P, and Geyer W R (2010) Advances in estuarine physics. Annu Rev Mar Sci 2: 35-58. annurev-marine-120308-081015.
- Mann R, Harding JM, Southworth MJ (2009) Reconstruction pre-colonial oyster demographics in the Chesapeake Bay, USA. Estuar. Coast. Shell Sci. 85: 217-222.
- Mathew S, Damoraran R (1997) Lipofuscin as physiological indicator of heavy metal stress in *Sunetta scripta* (yellow clam) and *Perna viridis* (green mussel). Indian J Mar Sci 26(1): 64-67.
- Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali (2014) [http://www.a-m-a.it/wp-content/uploads/2015/10/Estratto\\_Piano\\_Strategico\\_acquacoltura\\_2014-2020.pdf](http://www.a-m-a.it/wp-content/uploads/2015/10/Estratto_Piano_Strategico_acquacoltura_2014-2020.pdf)
- Montes J, Longa MA, Lama A, Guerra A (1998) Marteiliosis of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) reared in Galicia NW Spain. Bull Eur Assoc Fish Pathol 18: 124-126.
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins AJS (2007) Autophagis and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. Aquatic Toxicology 84: 80-91.
- Moyer MA, Blake NJ, Arnold WS (1993) An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). J Shellfish Res 12 (2): 305-310.
- Mubiana VK, Vercauteren K, Blust R (2006) The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. Environmental Pollution 144 (1): 272-279.
- Narváez DA, Klinck JM, Powell EN, Hofmann EE, Wilkin J and Haidvogel B (2012) Circulation and behavior controls on dispersal of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) larvae in Delaware Bay. J. Mar. Res. 70: 411-440.
- Newell RIE, Hilbish TJ, Koehn RK, Newell CJ (1982) Temporal variation in the reproductive cycles of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. Biol Bull 162: 299-310.
- Newman M (2008) In: Ecotoxicology: a comprehensive treatment – Chapter 4: Cells and Tissue 43-62 CRC Press by Taylor and Francis Group LLC.
- Ngo TTT, Berthe FCJ, Choi KS (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. Dis Aquat Org 56: 259-267.
- Norton JH, Perkins FP, Ledua E (1993) *Marteilia*-like Infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. J Invert Pathol 61 (3): 328-330.



- Novoa B, Posada D, Figueras A (2005) Polymorphisms in the sequence of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J Fish Dis* 28: 331-338.
- O'Connor WA, Dove MC (2009) The changing face of oyster culture in New South Wales, Australia. *J Shellfish Res* 28: 803-811.
- Pascual M, Martin AG, Zampatti E, Coatanea D, Defossez J, Robert R (1991) Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. ICES report, Copenhagen, Denmark.
- Pasqual S, Villalba A, Abollo E, Garci M, González AF, Nombela M, Posada D, Guerra A (2010) The mussel *Xenostrobus securis*: a well-established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biol Invasions* 12 (7): 2091-2103.
- Pazos AJ, Roman G, Acosta CP, Abad M, Sanchez JL Seasonal-changes in condition and biochemical-composition of the scallop pecten-maximus l from suspended culture in the ria de arousa (galicia, nw spain) in relation to environmental-conditions. *J of Exp Mar Biol Ecol* 211: 169-193.
- Pëllumb A, Ceschia G, Kapllan S (2006) First report of Marteiliosis in *Mytilus galloprovincialis* in Albania. *Ittiopatologia* 3: 47-52.
- Perkins FO, Wolf PH (1976) Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp.n.- haplosporidan pathogen of Australian oysters. *J Parasitol* 62: 528-538.
- Perkins FO (1993) Infectious diseases of molluscs. In: Couch J.A. Fournie J.W. (Eds.). *Advances in Fisheries Science: Pathobiology of marine and estuarine organisms* Boca Raton, CRC Press, pp. 255-287.
- Peters R, Raftos DA (2003) The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 223: 29-39.
- Poder M, Auffret M, Balouet G (1983) Etudes pathologiques et epidemiologiques des lesions parasitaires chez *Ostrea edulis* L. Primiers resultantsd' une recherché prospective comparative chez les principaux especes de mollusques des zones ostréicolesde Bretagne nord. Colloques sur les bases biologiques de l'aquaculture. CNRS-CNEXO, Montpellier, France, pp. 125-138.
- Powell EN, Barder RD, Kennicutt MC II, Ford SE (1999) Influence of parasitism in controlling the health, reproduction and PAH body burden of petroleum seep mussels. *Deep-Sea Res* 46: 2053-2078.
- Prioli, G. 2008. La molluschicoltura in Italia. En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 159-176.
- Hine PM (1991) Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis Aquat Org* 11: 163-171.
- Hine PM (1996) Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. *Rev Scient Tech Off Int Epizoot* 15: 563-577
- Hine PM (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immun* 9: 367-385.
- Hutchings P, Rainer S (1979) The polychaete fauna of Careel Bay, Pittwater, New South Wales, Australia. *J Nat Hist* 13: 745-796.
- Rayyan A, P Damianidis, C Antoniadou, Chintiroglou CC (2006) Protozoan parasites in cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (north Aegean Sea, Greece). *Dis Aquat Organ* 70: 251-254.
- Reg. 853/2004/CE del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L. 139 del 29 aprile 2004
- Reg. 854/2004/CE del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 139 del 30 aprile 2004.
- Reg. 2073/2005/CE della Commissione sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 338 del 15 novembre 2005.
- Reg. 1881/2006/CE della Commissione che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364 del 19 dicembre 2006.
- Reg. 1441/2007 della Commissione che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 322 del 5 dicembre 2007.
- Reg. 629/2008/CE della Commissione che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 173 del 2 luglio 2008.
- Reg. 1021/2008/CE della Commissione che modifica gli allegati I, II e III del regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda i molluschi bivalvi vivi, taluni prodotti della pesca e il personale assistente durante i controlli ufficiali nei macelli. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 277 del 17 ottobre 2008.
- Reg. 835/2011/UE della Commissione che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di idrocarburi policiclici aromatici nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 215 del 19 agosto 2011.

- Reg. 1259/2011/UE della Commissione che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi per i PCB diossina-simili e i PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 320 del 2 dicembre 2011.
- Renault T, Cochenne N, Chollet B (1995) Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. Dis Aquat Org 23: 161-164.
- Robert R, Borel M., Pichot Y, Trut G (1991) Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). Aquat Living Resour 4: 265-274.
- Robledo JAF, Figueras A (1995) The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK) from Galicia, Spain J Parasitol 81: 354-363.
- Robledo JAF, Santarem MM, Gonzalez P, Figueras A (1995a) Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic loads. Aquaculture 133: 311-322.
- Robledo JAF, Miahle E, Figueras A (1995b) Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: J.C. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, R.S. Anderson, K. Soderhall, B.A. Weeks-Perkins (Eds.). Techniques in fish immunology- 4. Immunology and pathology of aquatic invertebrates. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, pp. 117-121
- Roy MA, Robert MM (1978) Regulation and stability of host-parasite population interactions: I. Regulatory processes. J Animal Ecol 47: 219-247.
- Roubal FR, Masel J, Lester RJG (1989) Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. Aust J Mar Freshwat Res 40: 155-167.
- Ruano F, Dias MD (1994) Contribuição para o apoio a moluscicultura no estuário do Sado e Lagoa de Albufeira. Seminário sobre Recursos Haliénicos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade do Pescado de Península de Setúbal, Setúbal, 26 Abril 1994. Publicações avulsas do IPIMAR, pp. 195-205.
- Sandifer PA, Sutton-Grier AE (2014) Connecting stressors, ocean ecosystem services and human health. Nat. Resour. Forum 38: 157-167.
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010) Detection and description of a particular Ostreid Herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. Virus Res 153: 92-99.
- Shimeta J, Jumars PA (1991) Physical mechanisms and rates of particle capture by suspension-feeders. Oceanogr Mar Biol Annu Rev. 29: 191-257.
- Soudant P, Chu F-LE, Volety AK (2013) Host-parasite interactions: marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus species*. J. Invertebr. Pathol 114: 196-216.
- Suárez MP, Alvarez C, Molist P, San Juan F (2005) Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. J Shellfish Res 24: 531-540.
- Taveekijakarn P, Nash G, Somsiri T, Putinaowarat S (2002) *Marteilia*-like species: first report in Thailand. AAHRI News 11: 1-2.
- Thébault A, Baud JP, Le Saux JC, Le Roux F, Chollet B, Le Coguc MJ, Fleury PG, Berthe F, Gerard A (1999). Compte rendu sur les mortalité de juillet 1999 des moules (*Mytilus edulis*) en poches dans l'Aber Benoît. Rapport IFREMER, 1999, pp.12.
- Tigé G, Rabouin MA (1976) Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. Conseil International pour l'Exploitation de la Mer, CMK, vol. 21, pp. 1-10.
- Usero J, Morillo J, Gracia I (2005) Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. Chemosphere 59:1175-1181.
- Villalba A, Montes J, Carballal MJ, Lopez MC, Mourelle SG (1992) Epizootiology of Marteliasis in cultured mussels from estuaries of Galicia. Cuad Area Cienc Mar Semin Estud Galegos 201-202.
- Villalba A, Mourelle SG, Carballal MJ, Lopez MC (1993a) Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). Dis Aquat Org 17: 205-213.
- Villalba A, López MC, Carballal MJ (1993b) Parasites and pathologic conditions of three clam species, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides*, in the Galician Rias. In: Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura. Centro de Investigaciones Mariñas, Pontevedra, Spain, pp. 551-556.
- Villalba A, Mourelle SG, Carballal MJ, Lopez C (1997). Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rias of Galicia (NW Spain), Dis Aquat Organ 31: 127-139.
- Villalba A, Reece KS, Ordas MC, Casas SM, Figueras A (2004). Perkinsosis in molluscs: A review. Aquat Living Resour 17: 411-432.
- Villalba A, Iglesias D, Ramilo A, Darriba S, Parada JM, No E, Abollo E, Molares J, Carballal MJ (2014) Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*. Dis Aquat Org 109: 55-80.
- Virvilis C, Angelidis P, Photis G (2003). Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos Gulf in northern Greece. Bull Eur Ass Fish Pathol 23, 4: 157-162.
- Virvilis C, Angelidis P (2006) Presence of parasite. *Marteilia* sp. In the flat oyster (*Ostrea edulis* L.) in Greece. Aquaculture 259: 1-5.12.

- Ward JE, Shumway SE (2004) Separating the grain from the chaff: Particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J Exp Mar Biol Ecol* 300: 83-130.
- Wesche SJ (1995) Outbreaks of *Marteilia sydneyi* in Sydney rock oysters and their relationship with environmental pH. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 15: 23-27.
- Wesche SJ, Adlard RD, Lester RJG (1999) Survival of spores of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi* (Protozoa, Paramyxea) as assessed using fluorogenic dyes. *Dis Aquat Org* 36: 221-226.
- Widdows J (1973) The effects of temperature on the metabolism and activity of *Mytilus edulis* L. *Neth J Sea Res* 7: 387-398.
- Wilkins NP (1967) Starvation of the herring *Clupea harengus* L.: survival and some gross biochemical changes. *Comp Biochem Physiol* 23: 503-518.
- Wolf (1979) Life cycle and ecology of *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster, *Crassostrea commercialis*: *Mar. Fish. Rev.* 41: 70-72.
- Wootton EC, Dyrinda EA, Ratcliffe NA (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immun* 15: 195-210.
- OIE (2015) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015. CHAPTER 2.4.4 <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>.
- OIE (2015) Aquatic Animal Health Code CHAPTER 11.4 <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>.
- Zhang L, Li L, Guo X, Litman GW, Dichaw LJ, Zhang G (2015) Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci Rep* 5:8693.
- Zrnicic S, Le Roux F, Oraic D, Sostaric B, Berthe F (2001) First record of *Marteilia* sp. in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. *Dis Aquat Org* 44: 143-148.